

Série A, n° 811

N° d'ordre : 1694

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Pour obtenir le grade de Docteur ès sciences naturelles.

PAR

C. DELEZENNE

1^{re} THÈSE. — Le zinc constituant cellulaire de l'organisme animal.
Sa présence et son rôle dans le venin des serpents.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

SOUTENUES LE 28 JANVIER 1919 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. Y. DELAGE, Président.

G. BONNIER	} Examineurs.
HOUSSAY	
L. BERTRAND	

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1919

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Pour obtenir le grade de Docteur ès sciences naturelles.

PAR

C. DELEZENNE

- 1^{re} THÈSE. — Le zinc constituant cellulaire de l'organisme animal.
Sa présence et son rôle dans le venin des serpents.
- 2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

SOUTENUES LE 28 JANVIER 1919 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN



MM. Y. DELAGE, Président.

G. BONNIER	} Examineurs.
HOUSSAY	
L. BERTRAND	

PARIS
IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur
1. RUE CASSETTE, 1

1919

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen P. APPELL, *professeur*. Mécanique analytique et Mécanique céleste.

Professeur honoraire . . P. PUISEUX.

<i>Professeurs</i>	LIPPMANN	Physique.
	BOÛTY	Physique.
	BOUSSINESQ	Physique math. et calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	G. BONNIER	Botanique.
	KOENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	GOURSAT	Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET	Physique — —
	WALLERANT	Minéralogie.
	ANDOYER	Astronomie physique.
	PAINLEVÉ	Mathématiques rationnelles.
	HAUG	Géologie.
	HOUSSAY	Zoologie.
	H. LE CHATELIER	Chimie.
	G. BERTRAND	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
	C. CHABRIÉ	Chimie appliquée.
	G. URBAIN	Chimie.
	BOREL	Théorie des fonctions.
	MARCHIS	Aviation.
	J. PERRIN	Chimie physique.
	G. PRUVOT	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	MATRUCHOT	Botanique.
	ABRAHAM	Physique.
	CARTAN	Calcul différentiel et calcul intégral.
	C. GUICHARD	Géométrie supérieure.
	MOLLIARD	Physiologie végétale.
	LEBESGUE	Application de l'analyse à la géométrie.
	N.	Histologie.
N.	Physiologie.	
N.	Géographie physique.	

<i>Professeurs adjoints</i>	LEDUC	Physique.
	MICHEL	Minéralogie.
	HÉROUARD	Zoologie.
	L. BERTRAND	Géologie.
	R. PERRIER	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	COTTON	Physique.
	LESPIEAU	Chimie.
	GENTIL	Pétrographie.
	SAGNAC	Physique (Enseignement P. C. N.).
	PEREZ	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
N.	Mécanique et astronomie.	

Secrétaire D. TOMBECK.

LE ZINC

CONSTITUANT CELLULAIRE DE L'ORGANISME ANIMAL

SA PRÉSENCE ET SON RÔLE
DANS LE VENIN DES SERPENTS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550427_0041

AVANT-PROPOS

Nos recherches antérieures sur les venins de serpents nous avaient montré que leurs propriétés si particulières devaient être, du moins pour une grande part, rapportées à certaines diastases, dont nous avons établi l'existence et analysé le mode d'action.

Étant donné le rôle spécifique qu'on tend à attribuer aujourd'hui à des éléments minéraux déterminés dans la constitution des ferments organiques, nous eûmes à nous demander si ces diastases, remarquables par leurs caractères, ne comporteraient pas l'intervention de quelque élément métallique spécial. C'est de cette idée directrice qu'est né le présent travail.

Nous vîmes notre hypothèse prendre corps en soumettant à l'analyse spectrographique, avec le concours si précieux de M. A. de Gramont, les cendres de quelques venins : elles donnèrent les raies caractéristiques du zinc. Le contrôle chimique confirma cette donnée ; puis des dosages, obtenus par une technique sûre, dont nous avons approprié certains détails aux conditions de nos investigations, nous fournirent des chiffres précis : le zinc était, dans les venins de serpents, toujours présent, toujours même abondant.

Dès lors nous étions naturellement conduit à rechercher et, autant que possible, à doser, non seulement dans des sécrétions diverses, mais aussi dans le sang et les tissus d'un grand

nombre d'animaux, ce métal qui n'avait tenu, jusque-là, pour ainsi dire aucune place dans la biochimie animale.

Or nous avons constaté sa présence constante et souvent en proportion vraiment inattendue dans les cellules des tissus et du sang chez toutes les espèces que nous avons examinées à ce point de vue, et qui se situent à tous les échelons de la série zoologique.

Par des considérations sur lesquelles nous ne saurions anticiper, nous avons été amené à regarder le zinc comme un des constituants minéraux essentiels de toute cellule animale, et nous avons eu, par suite, à nous demander quelle idée préalable on peut se former de son rôle physiologique.

Une étude systématique des venins de serpents nous permettra peut-être, à cet égard, quelques présomptions, étant donné que, par l'examen comparatif de divers venins, nous avons eu une concordance remarquable entre leur teneur en zinc et l'intensité relative de certaines actions diastasiques spéciales.

Tels ont été le but et le plan général des recherches que nous allons exposer.

En terminant, je tiens à remercier tout particulièrement M. A. de Gramont, qui m'a si aimablement obligé au début de ces recherches.

Les longues et minutieuses analyses que j'ai eu à effectuer dans la suite ont pu être multipliées grâce au concours et au dévouement de M^{me} Ramart-Lucas et de M. H. Morel. Ils ont grandement facilité ma tâche. Je leur exprime ici toute ma gratitude.

CHAPITRE PREMIER

VUE D'ENSEMBLE ET DONNÉES GÉNÉRALES

L'expérience de Raulin et le zinc chez les végétaux. — Nos recherches chez les animaux. — Le zinc dans le sang des vertébrés. — Sa constance et son universalité dans les organes et les tissus dans la série animale. — Le zinc dans les venins des serpents. — Son rôle dans les actions catalytiques.

Dans un travail justement célèbre, paru il y a près de cinquante ans, Raulin (1) établissait que, parmi les éléments minéraux nécessaires à la végétation de l'*Aspergillus niger*, il fallait ranger, à côté du potassium, du magnésium et du fer, un métal dont on n'avait pas soupçonné jusque-là l'importance biologique : ce métal était le zinc.

On se rappelle par quelle suite logique de recherches, simples et minutieuses à la fois, Raulin a pu démontrer que le zinc, introduit à dose très faible dans les milieux artificiels où se développe l'*Aspergillus*, permet une végétation abondante, alors que le développement est impossible, ou donne lieu à des générations chétives quand le métal est absent ou reste en quantité insuffisante.

En montrant que le zinc, tout comme le fer, est un excitant indispensable du développement et de la croissance de l'*Aspergillus*, en établissant par ailleurs que le milieu qui renfermait primitivement ce métal devient impropre à la culture quand une ou plusieurs générations s'y sont succédé, Raulin devait être naturellement conduit à supposer que le zinc est réellement utilisé par la plante pour l'édification de son protoplasme et qu'il fait partie intégrante de celui-ci, comme les autres éléments minéraux déjà révélés par l'analyse dans les végétaux. Mais il lui manquait, pour faire de cette hypothèse, si vraisem-

(1) J. RAULIN : Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse doct. sciences physiques*. Paris 1870.

blable qu'elle fût, une vérité démontrée, la preuve expérimentale directe de la présence constante du zinc dans l'*Aspergillus* complètement développé.

On sait que cette preuve a été définitivement apportée depuis lors (Javillier) et aucun doute ne peut subsister aujourd'hui sur la réalité de l'utilisation du zinc, au cours du développement, non seulement par les végétaux inférieurs tels que les moisissures ou les levures, mais encore par les plantes les plus élevées en organisation. Le zinc s'est révélé, en effet, comme un élément largement diffusé dans tout le règne végétal, où il n'avait été signalé jusque-là qu'incidemment et dans des cas particuliers (plantes calaminaires).

Dans un travail d'ensemble sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux, paru il y a une dizaine d'années, Javillier (1) a établi que ce métal se rencontre à doses non négligeables « dans les végétaux les plus divers et prélevés sur des terrains géologiquement et chimiquement distincts ».

Utilisant une méthode très précise de recherche et de dosage, qu'il a appliquée systématiquement chez plus de cinquante végétaux, appartenant à des familles différentes, ce savant a trouvé le zinc dans presque tous les organes : racine, tige, fleur, feuille, graine où il l'a recherché.

Cette extrême diffusion du zinc, dans tout le règne végétal et dans les divers organes de la plante, donne à penser que ce métal joue un rôle physiologique important, mais quel est ce rôle ? Aucune donnée positive n'a permis jusqu'ici de le préciser, ni même de l'entrevoir.

Chez les animaux, le zinc n'a jamais été considéré par les physiologistes comme un élément minéral digne de retenir l'attention. Aucun traité didactique, sans excepter les plus complets et les plus récents, ne le mentionne parmi les métaux que l'on trouve normalement, même à l'état de trace, dans l'organisme des vertébrés, et si quelques ouvrages spéciaux rappellent qu'il a été rencontré quelquefois dans certains organes de l'homme ou des animaux domestiques, c'est pour

(1) M. JAVILLIER : Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. Thèse doct. sciences naturelles. Paris 1908.

- le considérer, à l'exemple du cuivre, du plomb ou de l'étain, comme un élément anormal ou accidentel.

D'ailleurs les indications bibliographiques relatives à la recherche du zinc chez les animaux, sont des plus réduites. En ce qui concerne les vertébrés, nous ne pouvons signaler que deux courtes notes, parues la même année (1877), dans lesquelles les auteurs, spécialement préoccupés de la recherche toxicologique du zinc chez l'homme, signalent qu'on peut trouver ce métal, en petite quantité, dans certains aliments et aussi dans le foie des cadavres, où il est communément associé au cuivre. Lechartier et Bellamy (1) décèlent le zinc et en font le dosage dans deux foies de phtisiques. Raoult et Breton (2) le trouvent également dans cinq analyses portant sur des foies humains qui provenaient de sujets morts d'affections diverses. En dehors du foie, Raoult et Breton n'ont recherché ce métal que dans l'intestin (intestin d'un noyé) où ils ne l'ont pas rencontré. Lechartier et Bellamy le signalent dans le foie et le tissu musculaire du bœuf (une seule analyse) et en trouvent aussi de petites quantités dans l'œuf de poule.

Si l'on met à part les résultats de ces dernières analyses, restées isolées, et qui n'ont jamais été confirmées depuis, on voit que les seules données peut-être dignes d'être retenues, en raison de leur concordance, ont trait à la présence du zinc dans le foie humain. Mais outre qu'il s'agissait, dans tous les cas, d'organes pathologiques, la présence du zinc en petite quantité dans le foie, tout particulièrement chez l'homme, ne devait avoir, aux yeux des physiologistes, aucune signification qui méritât de les arrêter : on sait depuis longtemps que les métaux fortuitement introduits dans le tube digestif, ou ingérés dans un but thérapeutique, sont retenus par le foie, s'ils arrivent à franchir la barrière épithéliale de l'intestin. Tel est toujours le cas, par exemple, pour le cuivre, le plomb, ou l'étain ; on était donc en droit de penser qu'il en était de même pour le zinc ; aussi n'est-il pas surprenant que le zinc ait toujours été

(1) G. LECHARTIER et F. BELLAMY : Sur la présence du zinc dans le corps des animaux et dans les végétaux. *C. R.*, t. LXXXIV, p. 687, 1877.

(2) F. RAOULT et H. BRETON : Sur la présence ordinaire du cuivre et du zinc dans le corps de l'homme. *C. R.*, t. LXXXV, p. 40, 1877.

simplement considéré comme « un constituant anormal ou accidentel de l'organisme des vertébrés ».

Pour ce qui est des invertébrés, le zinc a été signalé, il y a une quinzaine d'années, par Bradley (1), dans les cendres de l'hépatopancréas d'un grand mollusque, le *Sycotypus canalicatus*, et dans celles de *Fulgur carica*. La quantité relativement élevée de zinc trouvée par Bradley dans les cendres de *Sycotypus* et de *Fulgur* l'a conduit à considérer ce métal comme un élément normal de l'organisme de ces animaux. Mais il lui a été impossible de retrouver le zinc dans toute une série d'autres mollusques, comme aussi chez divers crustacés qu'il a examinés à ce point de vue. Il conclut qu'il s'agit là d'un fait exceptionnel, dont il reste à déterminer la signification (2). On sait depuis longtemps que, chez les invertébrés, les constituants minéraux sont loin d'avoir la fixité qu'on leur connaît chez les vertébrés et il n'eût pas été surprenant que le zinc fût l'apanage de quelques types, à l'exemple du cuivre ou du manganèse qui, chez certains invertébrés, remplacent le fer dans la constitution des pigments respiratoires.

Somme toute, les biologistes semblaient autorisés jusqu'ici à considérer le zinc comme un élément purement accidentel de l'organisme des vertébrés ou, tout au plus, comme un constituant absolument exceptionnel de quelques invertébrés. Or il en est tout autrement.

Le zinc, en effet, comme le calcium, le magnésium ou le fer, se rencontre d'une façon constante chez tous les animaux. Fait plus curieux, il n'y est pas seulement présent à l'état de traces — à la façon de certains éléments minéraux tels que l'arsenic, le bore ou le manganèse, que l'analyse a permis de révéler au cours de ces dernières années, — mais on le trouve toujours, en quantités très appréciables, dans le sang et, à un taux plus considérable encore, dans les organes. Dans le sang des mammifères, par exemple, nous en avons constaté une moyenne de

(1) H. C. BRADLEY : The occurrence of zinc in certain Invertebrates. *Science N. S.*, t. XIX, January, June 1904, p. 196.

(2) « The significance of this unique occurrence of zinc in economy of *Sycotypus* and *Fulgur* is still to be determined as is the nature of combination in which it exists. »

15 à 25 milligrammes par litre; teneur qui est sensiblement celle du magnésium; le taux du calcium lui-même est à peine deux ou trois fois plus élevé. Les organes les plus riches : les centres nerveux et le thymus, peuvent en contenir près de 1 décigramme par kilogramme, et ceux qui en renferment le moins, comme le muscle, ont encore une teneur en zinc qui atteint le plus souvent $1/40.000$ ou $1/50.000$ de leur poids. Chez les autres vertébrés et nombre d'invertébrés il n'est pas rare que les organes ou les tissus en renferment des quantités plus grandes encore. Mais le fait capital à retenir est celui-ci : quelle que soit l'espèce animale envisagée, quels que soient l'organe ou le tissu soumis à l'analyse, le zinc peut toujours être décelé et presque toujours dosé assez exactement.

La présence constante du zinc chez les animaux dans toute la série, sa diffusion dans tous les organes et vraisemblablement dans toutes les cellules, permettent de regarder cet élément comme un constituant minéral essentiel de l'organisme animal, et c'est là précisément une des conclusions fondamentales de ce travail.

Un métal aussi généralement répandu et aussi largement distribué ne saurait être considéré, pour les animaux, comme un élément purement passif : il doit remplir un rôle actif.

Essayer d'emblée de surprendre la nature de sa fonction dans le milieu si complexe de la cellule elle-même eût été, on le devine aisément, une entreprise bien difficile, et qui sans doute fût restée longtemps infructueuse. Une circonstance favorable nous a permis d'aborder le problème par une autre voie et de déterminer au moins un des rôles les plus curieux du zinc chez les animaux : son exceptionnelle abondance dans le venin des serpents nous a offert pour sujet d'étude une sécrétion cellulaire hautement différenciée et particulièrement remarquable par ses propriétés physiologiques.

Le zinc est en effet, on peut le dire, l'élément minéral véritablement caractéristique des venins de serpents. Avec les constituants en quelque sorte banaux, tels que le potassium, le sodium, la chaux ou la magnésie, plus ou moins répandus dans tous les liquides organiques, le zinc est, dans les venins, le seul métal que révèle l'analyse; dans certains d'entre eux il

est en telles proportions qu'il peut constituer, à l'état d'oxyde, plus de 20 % des cendres.

Or les venins, nous le démontrons par ailleurs, sont de puissants catalyseurs. Ajoutés, à dose souvent infime, à des liquides organiques ou à des produits d'origine cellulaire riches en phosphatides ou en nucléines, ils provoquent, par leur seule présence, des réactions chimiques qui suffisent à expliquer, pour une grande part tout au moins, leur nocivité.

Avec M^{lle} Ledebt, nous avons montré, il y a quelques années, que la lécithine se dédouble sous l'influence des venins en donnant un produit nouveau, chimiquement défini et cristallisable : la lysocithine (Delezenne et Fourneau) qui est un poison hémolytique et cytolytique des plus puissants.

Avec notre élève H. Morel, nous avons observé, depuis lors, que les venins de serpents catalysent également d'autres produits phosphorés complexes qui sont parmi les constituants fondamentaux du noyau cellulaire : les acides nucléiques.

Etant donné ce que nous ont appris les recherches classiques de G. Bertrand sur le rôle du manganèse dans l'action des oxydases, il y avait lieu de se demander si le zinc n'est pas un constituant minéral essentiel des diastases des venins, et si les propriétés catalytiques qui leur appartiennent ne sont pas étroitement subordonnées à la présence de ce métal. L'expérience nous a permis de constater qu'il en était bien ainsi.

Comme on le verra dans le cours de ce travail, les activités diastasiques *propres* aux venins sont toujours nettement en rapport, dans leur intensité, avec les quantités de zinc décelées par l'analyse. Non seulement les venins les plus riches sont aussi les plus actifs, mais l'échelle d'activité de toute une série de venins différents s'est montrée superposable, en quelque sorte, à l'échelle de leur teneur en zinc. Dans un même venin, les variations individuelles que l'on peut observer suivent aussi un même parallélisme, de sorte qu'il est souvent possible, par le dosage préalable du zinc dans un échantillon donné, de déterminer assez exactement à l'avance son degré d'activité.

S'ensuit-il que le zinc soit le seul élément intéressant à considérer dans les diastases des venins ? Non, assurément. Ce

métal ou ses sels se sont montrés, par eux-mêmes, tout à fait inefficaces. D'autre part, ajoutés, en quantités plus ou moins grandes, aux venins les plus pauvres en zinc et, par le fait, les moins actifs, ils ne renforcent aucunement leur action. La substance organique à laquelle le zinc est combiné, ou qui forme avec lui un complexe colloïdal diastasique, doit donc jouer, comme le métal lui-même, un rôle des plus importants.

Si, dans l'ensemble du complexe diastasique, le zinc constitue vraisemblablement le catalyseur proprement dit, l'élément chimiquement actif, il faut néanmoins regarder la substance organique à laquelle ce métal est lié comme une partie complémentaire indispensable, qui, par ses propriétés chimiques ou physico-chimiques, conditionne l'activité du ferment. Mais cette substance, nous devons le faire remarquer, représente encore, dans le complexe diastasique, quelque chose de plus, puisque c'est elle, sans nul doute, qui confère aux diastases des venins un de leurs attributs les plus intéressants, celui de provoquer, dans les processus d'immunisation, la formation d'antidiastases nettement spécifiques.

Cette conception ne se différencie guère, on le voit, de celle qu'a exposée pour la première fois notre collègue et ami Gabriel Bertrand, à propos de ses recherches sur le rôle du manganèse dans la laccase, et que la plupart des biologistes ont adoptée. Des recherches ultérieures permettront seules de déterminer dans quelle mesure elle est applicable au cas que nous considérons. Le fait essentiel à invoquer en faveur de cette conception : l'étroite subordination de certaines actions diastases à la présence du zinc, nous paraît tout au moins définitivement acquis.

Ces notions nous semblent prendre un intérêt particulier si nous considérons que les venins sont des toxines, que leurs propriétés de toxines sont, du moins pour une part, liées à leurs propriétés de ferments et que celles-ci à leur tour sont subordonnées à la présence d'un métal déterminé.

Y aura-t-il lieu d'appliquer ces données nouvelles à d'autres toxines? Tout au moins n'est-il pas, croyons-nous, interdit de le présumer.

D'un autre côté, la nature des actions opérées par les venins et auxquelles le zinc est associé est évidemment propre à nous suggérer des hypothèses plausibles sur les actions que ce métal exerce dans l'intimité même de la cellule animale, où nous avons vu que sa présence est constante. Toutes ces actions ne seraient-elles pas du même ordre ? Certains enchainements de faits renforcent singulièrement cette supposition : parmi les effets les plus caractéristiques que nous avons constatés *in vitro*, figure l'intervention du zinc dans le dédoublement des phosphatides et des acides nucléiques ; d'autre part, on sait que ces substances ont une importance toute particulière dans le métabolisme cellulaire, et enfin — fait éminemment suggestif — c'est précisément dans les organes où elles sont le plus abondantes que le zinc lui-même atteint son taux le plus élevé.

Ainsi les faits que nous a permis de relever l'étude des venins *in vitro* peuvent être considérés très logiquement, ce nous semble, comme les témoins observables des propriétés que le zinc manifeste, sans doute sous d'autres formes et avec des modalités différentes, dans l'intimité de la voie cellulaire.

Si curieux que soient ces faits à divers égards, c'est peut-être de cette considération qu'ils tireront, dans l'avenir, leur principal intérêt.

CHAPITRE II

TECHNIQUE DE LA RECHERCHE DU ZINC CHEZ LES ANIMAUX

Procédés de caractérisation du zinc. — Exigences de techniques spéciales aux tissus animaux. — Causes d'erreurs inhérentes à l'incinération. — Nécessité de la destruction chimique de la matière organique. — Application de la méthode Bertrand-Javillier au dosage du zinc chez les animaux.

Le zinc est un métal facile à identifier chimiquement. Il possède des caractères analytiques nets, dont deux d'entre eux sont spécifiques et permettent aisément de le reconnaître, lorsqu'il a été séparé, au préalable, des autres métaux qui peuvent l'accompagner.

En solution ammoniacale, les sels de zinc donnent, avec le sulfure d'ammonium, un précipité blanc de sulfure de zinc. En solution légèrement acidulée par un acide organique (formique ou acétique) ils donnent le même précipité lorsqu'on les soumet à l'action de l'hydrogène sulfuré.

Avec le ferrocyanure de potassium, les sels de zinc donnent un précipité blanc jaunâtre de ferrocyanure de zinc, peu soluble dans l'acide chlorhydrique.

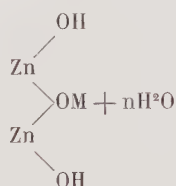
En solution aqueuse, les sels de zinc donnent, par addition d'ammoniaque, de potasse ou de soude, un précipité gélatineux blanc d'oxyde très facilement soluble dans un excès de réactif. L'oxyde de zinc, blanc à froid, jaunit lorsqu'on le chauffe et reprend sa couleur primitive par refroidissement.

De ces réactions bien connues, les deux premières seules sont à retenir pour nous, tant à cause de leur spécificité qu'en raison du degré de sensibilité qu'elles présentent. Comme l'indique Javillier, on peut pratiquement, par l'une ou l'autre de ces réactions, caractériser le zinc avec certitude lorsque sa dilution ne dépasse pas le vingt-millième, de sorte qu'à la condition d'être réunie dans un petit volume de liquide — 1 centimètre

cube par exemple — une quantité de zinc qui ne dépasse pas 0 milligr. 05 peut encore être aisément reconnue par l'hydrogène sulfuré ou le ferrocyanure.

Lorsqu'il s'agit de caractériser de petites quantités de zinc, il est donc important d'être en possession d'une méthode permettant de rassembler tout le métal dans un volume de liquide aussi petit que possible. G. Bertrand et Javillier (1) ont précisément indiqué, en vue de la recherche biologique du zinc, un procédé de dosage basé sur la précipitation facile et complète de ce métal par les métaux alcalino-terreux.

En solution ammoniacale, l'hydroxyde de zinc s'unit à ces métaux (G. Bertrand, 1892) pour donner des zincates insolubles cristallisables, répondant à la formule générale.



Ces composés sont si peu solubles que l'on peut, par cette méthode, précipiter le zinc renfermé à l'état de traces dans une très grande quantité de liquide. De plus, précipités à l'état micro-cristallin d'un liquide bouillant, ces composés sont faciles à recueillir sur les filtres, qu'ils ne traversent pas.

G. Bertrand et Javillier ont, dans la pratique, utilisé la chaux et montré que leur méthode de séparation est à la fois d'une très grande sensibilité et d'une grande précision, et qu'elle peut être appliquée avec sûreté aux dosages de très petites quantités de zinc.

C'est elle que Javillier a constamment employée dans ses études sur le zinc chez les végétaux et c'est à elle que nous avons eu également recours le plus souvent dans les expériences

(1) G. BERTRAND et M. JAVILLIER : Sur une méthode permettant de doser de très petites quantités de zinc. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXLV, p. 924, 1907; *B. Soc. chim.*, 4^e s., t. III, p. 495, 1908; *B. Sc. pharm.*, t. XV, pp. 7-10, 1908 et M. JAVILLIER, *Thèse*, 1910.

que nous avons instituées en vue de la recherche et du dosage du zinc chez les animaux.

Il est à remarquer toutefois que l'emploi de cette méthode ne s'impose pas dans tous les cas. Son avantage, nous venons de le voir, est de réunir, de ramasser en quelque sorte des traces de zinc disséminées dans une grande quantité de liquide ou perdues dans une grande masse de cendres. Or, chez les animaux, le zinc se rencontre dans les cendres de divers organes ou de certaines sécrétions en quantités suffisantes pour qu'il puisse être dosé en utilisant les méthodes ordinaires de séparation de la chimie analytique. Nous nous sommes assuré d'ailleurs que dans ces cas spéciaux l'emploi parallèle de la méthode Bertrand-Javillier et d'une méthode plus simplifiée donne sensiblement les mêmes résultats.

Ces données générales étant posées, voyons maintenant comment nous avons opéré dans la pratique :

Les liquides organiques (sang ou sécrétions) et les organes ou les tissus, provenant d'animaux sacrifiés par saignée, étaient exactement pesés (les organes et les tissus après avoir été rapidement pulpés) et mis à dessécher dans le vide sulfurique ; la dessiccation étant achevée, s'il était nécessaire, sur l'acide phosphorique. Le résidu sec, pulvérisé et rendu aussi homogène que possible, était pesé, et une portion déterminée était prélevée en vue de l'analyse.

La première opération à réaliser était la destruction de la matière organique. Deux procédés pouvaient être employés dans ce but : l'incinération et la destruction chimique.

L'incinération est le moyen le plus généralement employé. Il est simple et relativement rapide. Mais il peut parfois introduire du zinc là où il n'en existe pas et surtout il expose à des pertes qui, dans certaines conditions, peuvent être élevées, quelles que soient les précautions prises en vue de les éviter : on sait qu'en présence de charbon, l'oxyde de zinc est facilement réduit à la température du rouge et le métal volatilisé.

On peut éviter ces pertes en calcinant à une température qui ne dépasse point le rouge sombre, chose relativement aisée lorsqu'on a affaire à des matières organiques riches en sels

alcalins et faciles à brûler; c'est le cas des matières organiques végétales, et Javillier, dans ses recherches sur le zinc des végétaux, s'est arrêté à ce procédé de destruction qu'il a considéré comme étant parfaitement adéquat au cas spécial qu'il avait envisagé. Il n'en va plus de même lorsqu'on incinère des tissus animaux. Pauvres en sels alcalins, ces tissus fournissent une quantité considérable de charbon, souvent très difficile à brûler, même s'il est soumis à des lessivages répétés. L'opération, qui est toujours longue, expose à des surchauffes locales et laisse fréquemment un résidu important de charbon non brûlé, dans lequel le zinc peut rester inclus. Pour obtenir la combustion complète, il faut atteindre des températures qui amènent inévitablement une perte de zinc qui, dans certains cas, nous avons pu nous en assurer, peut être extrêmement importante.

La destruction de la matière organique par voie chimique ne présente aucun de ces inconvénients. C'est une méthode sûre, à la condition, bien entendu, de n'utiliser que des réactifs absolument purs, et c'est elle que nous avons constamment employée.

La combustion était faite par le mélange azoto-sulfurique en suivant la technique de Neumann.

Le résidu sec des organes ou des liquides dans lesquels nous avions à rechercher le zinc était introduit dans un ballon et additionné peu à peu d'un mélange, à parties égales, d'acide sulfurique et d'acide nitrique chimiquement purs. 5 centimètres cubes du mélange étaient en général utilisés pour 4 à 5 grammes de matière sèche. Quand la liquéfaction complète était obtenue, on commençait à chauffer le contenu du ballon, doucement d'abord, puis en élevant progressivement la température et en faisant tomber goutte à goutte, dans le mélange, de l'acide nitrique, jusqu'à ce que la matière organique soit totalement oxydée. On arrêtait l'opération quand le liquide était devenu parfaitement incolore ou ne conservait plus qu'une teinte blanc jaunâtre à peine appréciable. Le contenu du ballon, transvasé dans un becher ou une capsule de platine, était porté ensuite au bain de sable dans le but d'évaporer complètement l'acide sulfurique. S'il était utile, on finissait de chasser

celui-ci en chauffant à feu nu, ce qui permettait en outre d'éliminer — et cette fois sans crainte de perte — les dernières traces de matière organique qui avaient pu échapper à la combustion.

Le résidu, représentant un mélange plus ou moins complexe de matières minérales, duquel il fallait maintenant séparer le zinc, était traité par l'acide chlorhydrique concentré, puis évaporé à siccité au bain-marie. Repris par de l'acide chlorhydrique étendu et filtré pour être débarrassé de la silice, du sulfate de chaux et d'autres constituants insolubles éventuels, il était précipité par l'ammoniaque concentrée. Pour cela, le filtrat et les eaux de lavage qui lui sont réunies sont versés goutte à goutte dans une solution d'ammoniaque pure, employée en telle quantité que le mélange final renferme 4 à 5 % de NH_3 libre, soit 20 à 25 % de la solution ammoniacale saturée.

On ajoute quelques centimètres cubes d'eau oxygénée et une certaine quantité de lait de chaux. Il se fait un précipité volumineux, plus ou moins coloré par l'oxyde de fer, qui se réunit peu à peu. Le zinc est resté dans la liqueur ammoniacale et il n'en a pas été entraîné si l'on a eu soin de verser la solution lentement dans l'ammoniaque et d'employer un grand excès de celle-ci. On filtre, on lave le précipité, puis on le redissout dans l'acide chlorhydrique concentré, et on fait une deuxième précipitation et une nouvelle filtration.

Les liqueurs ammoniacales réunies renferment tout le zinc et avec lui divers autres éléments : sels alcalins, chlorure de calcium, magnésie, cuivre, etc. On porte à l'ébullition et on ajoute peu à peu un lait de chaux étendu, en quantité suffisante pour libérer totalement l'ammoniaque combinée et précipiter tout le zinc à l'état de zincate. L'ébullition est poursuivie tant qu'il se dégage des vapeurs alcalines, ce qu'on vérifie en maintenant une bande de papier tournesol humide dans le col du ballon. Quand l'opération paraît terminée, il est encore nécessaire de s'assurer, par l'addition d'un peu de lait de chaux et en continuant l'ébullition, que toute l'ammoniaque est véritablement dégagée. En effet, s'il en restait un peu à l'état de sel dans la solution, ce serait la preuve que celle-ci ne contient pas de chaux libre; et dans ce cas le zincate ne pourrait se former.

Quand on a la certitude que l'ammoniaque est totalement dégagée, on filtre; le précipité renferme le zincate de chaux, de la chaux libre, du carbonate et du sulfate de chaux, de la magnésie, du cuivre à l'état de traces (ou en quantité très appréciable si l'on a affaire à du sang ou des organes d'invertébrés), et presque toujours de très minimes quantités de fer que le traitement ammoniacal n'a point rigoureusement éliminé. On lave le précipité et les parcelles de celui-ci, restées adhérentes aux parois du ballon, avec de l'eau saturée de chaux, puis on le redissout avec de l'acide chlorhydrique à 10 %, en faisant en sorte que la solution finale obtenue contienne au moins 5 % d'acide chlorhydrique. Cette solution est saturée d'hydrogène sulfuré, abandonnée au repos pendant quelques heures et filtrée.

Le liquide, qui a été débarrassé du cuivre, et éventuellement du platine qui a pu y être introduit au cours des opérations, est évaporé à siccité; le résidu, redissous dans quelques centimètres cubes d'une solution à 10 % d'acétate d'ammonium acidulée par l'acide acétique, est transvasé dans un petit flacon et le liquide saturé d'hydrogène sulfuré. Le flacon soigneusement bouché est abandonné au repos pendant vingt-quatre heures au moins.

Le précipité de sulfure est recueilli sur un petit filtre, lavé avec de l'eau renfermant 5 % d'acide acétique et saturée d' H_2S , puis dissous sur le filtre avec quelques centimètres cubes d'acide sulfurique; on lave le filtre à plusieurs reprises avec de l'eau, et la solution, recueillie dans une capsule de platine tarée, est évaporée à sec, d'abord au bain-marie, puis par chauffage direct, jusqu'à volatilisation complète de l'acide en excès. Le résidu est du sulfate de zinc anhydre, dont le poids, multiplié par 0,4052, donne la quantité de zinc contenu dans la substance analysée.

Quand la matière à analyser renfermait une assez forte proportion de zinc et que ce métal représentait une partie relativement importante des cendres, il n'était pas nécessaire — nous l'avons dit plus haut — de le précipiter à l'état de zincate de chaux pour obtenir un dosage exact. Dans ce cas, après avoir traité par l'ammoniaque concentrée, comme il a été indiqué plus haut, nous évaporions immédiatement à sec les liqueurs ammo-

niacales et nous reprenions d'emblée le résidu par l'acide chlorhydrique à 5 %. A partir de là, la série des opérations ayant pour but d'éliminer le cuivre, de précipiter le zinc à l'état de sulfure et de l'amener finalement à l'état de sulfate pour la pesée, était conduite exactement comme nous venons de le décrire.

Quand toutes les opérations sont terminées, il est toujours utile de s'assurer que le résidu est constitué, et exclusivement constitué, par du sulfate de zinc : le résidu doit être entièrement soluble dans l'eau et donner avec le ferrocyanure de potassium le précipité blanc caractéristique de ferrocyanure de zinc ; traité à nouveau par H^2S , il doit se transformer totalement en sulfure de zinc. Il arrive parfois que, par suite d'un chauffage à une température trop élevée, le sulfate acide de zinc se transforme partiellement en sulfate basique extrêmement peu soluble. L'addition d'une trace d'acide sulfurique, suivie d'une nouvelle évaporation, doit dans ce cas donner un produit totalement soluble.

Très souvent aussi, le sulfate de zinc est légèrement coloré par une trace d'oxyde de fer, tant il est difficile d'éliminer totalement ce métal au cours des traitements successifs.

Si l'on a des raisons de supposer qu'il s'agit d'une quantité de fer pondéralement appréciable, il suffit, pour obtenir le sulfate de zinc tout à fait pur, de reprendre le résidu par l'ammoniaque, de filtrer, d'évaporer à siccité dans une capsule de platine tarée, et de transformer à nouveau en sulfate. Une nouvelle pesée montre d'ailleurs que très généralement il n'y a pas lieu de tenir compte de cette trace infime de fer entraînée. Une quantité négligeable de fer peut cependant suffire, lorsqu'elle est mélangée sous la forme de sulfure à quelques milligrammes seulement de sulfure de zinc, à enlever à ce dernier la teinte blanc pur qui permet de le caractériser avec certitude. Et, abstraction faite des pertes causées par l'incinération, c'est, pensons-nous, faute d'avoir éliminé complètement le fer au cours des opérations, que les auteurs, dans leurs analyses des tissus animaux, n'y avaient pour ainsi dire jamais relevé la présence du zinc.

Si nous sommes entré dans d'aussi longs détails sur la

méthode d'analyse que nous avons employée, c'est qu'il nous a paru essentiel de préciser parfaitement toutes les conditions d'une technique à laquelle sont subordonnés les résultats fondamentaux de notre travail.

Cette technique est laborieuse et exige une longue série de manipulations qui demandent à être faites avec le plus grand soin.

La seule cause d'erreur importante qu'il y eût à d'éviter était l'introduction accidentelle du zinc par les réactifs employés.

Les réactifs, même dits purs, du commerce ne pouvaient évidemment convenir, et nous avons préparé ou fait préparer, tout spécialement en vue des analyses, de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique, de l'acide nitrique et de l'ammoniaque complètement exempts de zinc. Nous nous sommes d'ailleurs assuré, par une série de contrôles, qu'aucun d'eux ne renfermait la moindre trace de ce métal.

L'eau distillée ordinaire des laboratoires contient souvent de très minimes quantités de zinc, comme elle contient du cuivre ou de l'étain. Nous n'avons jamais utilisé que de l'eau soigneusement redistillée dans un appareil en verre. Les solutions salines dont nous avons eu à nous servir dans certains essais de dialyse étaient faites également dans de l'eau soigneusement redistillée.

Enfin la chaux dite pure du commerce renferme quelquefois, elle aussi, de minimes quantités de zinc. Pour éviter tout apport de ce métal, même très faible, par la chaux employée, nous avons préparé celle qui a servi à nos analyses, en partant d'azotate de calcium pur. La solution d'azotate était précipitée par l'acide oxalique, et l'oxalate de calcium formé, soigneusement lavé, était soumis à la calcination jusqu'à transformation en chaux vive.

Toutes ces précautions, bien que n'étant jamais superflues, ne s'imposaient pas dans tous les cas avec la même rigueur. Lorsqu'il s'agissait d'organes ou de produits normalement très riches en zinc, les réactifs, à moins d'être d'une très grande impureté, ne pouvaient, par leur apport, que fausser légèrement les résultats. Par contre, il était essentiel d'éviter toute introduction accidentelle de zinc, si petite qu'elle fût, lorsqu'on avait à rechercher

ce métal dans un liquide organique ou un tissu qui normalement n'en renferme pas ou n'en contient, tout au plus, que des traces.

Plus que toute autre la méthode spectrographique, appliquée à l'étude des cendres obtenues par simple calcination et sans emploi de réactifs, permet une conclusion sûre, lorsqu'elle donne des résultats positifs. C'est elle, il est intéressant de le rappeler, qui avait permis à Demarçay (1) de déceler le zinc dans quelques végétaux et à Dieulafait de montrer (2) la grande diffusion de ce métal dans le monde minéral et de constater sa présence constante dans l'eau de mer.

Avec l'aide de M. de Gramont, nous avons, de notre côté, appliqué cette méthode à l'étude des cendres de quelques venins et c'est elle, on le verra, qui, d'emblée, nous a permis d'y caractériser le zinc avec certitude.

(1) DEMARÇAY : Sur la présence dans les végétaux du vanadium, du molybdène et du chrome. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXI, p. 91, 1910.

(2) DIEULAFAIT : Sur le zinc, etc.. *Ann. Chim. et Phys.*, 5^e S., t. XXI, p. 256, 1880.

CHAPITRE III

LE ZINC DU SANG CHEZ LES VERTÉBRÉS

Constance du zinc dans le sang. — Son taux. — Étude séparée du plasma et des éléments figurés. — Abondance relative du zinc dans les leucocytes.

Le zinc n'a jamais été signalé dans le sang des vertébrés, et cependant — nous allons l'établir — sa présence y est constante et relativement facile à mettre en évidence. Fait plus curieux, il ne s'agit pas là d'un de ces éléments minéraux qui, tout en faisant partie, chez les vertébrés, des constituants normaux, ne s'y trouvent jamais qu'à l'état de traces, comme le manganèse, l'arsenic ou le bore : le taux du zinc dans le sang des vertébrés est relativement élevé, il est du même ordre de grandeur que celui du magnésium ou du calcium.

La recherche du zinc dans le sang a été faite en suivant rigoureusement les indications techniques exposées dans le chapitre précédent.

Nous avons employé généralement le sang artériel; chez le cheval et le bœuf, nos analyses ont cependant porté sur le sang veineux. Bien entendu, quand nous avons affaire à des espèces de petite taille, l'analyse était faite sur un mélange du sang de plusieurs sujets.

Dans tous les cas, les animaux saignés étaient à jeun depuis vingt-quatre heures au moins. Le sang, reçu dans une capsule plate préalablement tarée, était mis à dessécher aussitôt dans le vide, en vue des opérations ultérieures.

Pour une recherche purement qualitative, il suffisait, en général, de 8 à 10 grammes de sang. Pour les dosages, par contre, il était utile de prélever au moins 30 à 50 grammes; souvent même, surtout quand il s'agissait de grands animaux, nous employions jusqu'à 100 grammes.

Chez les mammifères, nous avons recherché et mis en évidence le zinc dans le sang de sept espèces différentes, appartenant elles-mêmes, pour la plupart, à des ordres distincts. Le dosage précis a été réalisé chez six espèces; pour deux d'entre elles il a été répété plusieurs fois.

Le taux du zinc dans le sang des mammifères paraît relativement fixe. Qu'il s'agisse d'une même espèce ou d'espèces très différentes, les variations observées restent toujours dans des limites assez étroites. Le chiffre le plus élevé que nous ayons obtenu, et qui a trait au sang du lapin, correspond à une teneur de 26 milligrammes par kilogramme, c'est-à-dire sensiblement par litre; le chiffre le plus faible, celui qu'a fourni le cheval, atteint encore 15 milligrammes. Chez le lapin, trois dosages portant sur des animaux différents, mais soumis depuis plusieurs mois au même régime, ont donné respectivement 19, 23 et 26 milligrammes par litre.

On voit donc qu'en règle générale le taux du zinc dans le sang des mammifères peut être considéré comme oscillant entre 15 et 25 milligrammes par litre.

Cette quantité, il importe de le souligner, est loin d'être négligeable : elle correspond, pour certaines espèces, au taux du magnésium; le taux du calcium lui-même n'est souvent que deux à trois fois plus élevé.

Chez les oiseaux et les reptiles, nous avons trouvé sensiblement le même pourcentage que chez les mammifères.

Seule la vipère nous a donné un chiffre un peu plus fort. Serait-ce également le cas pour les autres ophidiens venimeux? Nous ne saurions le dire, n'ayant pas eu la possibilité, faute d'une quantité suffisante de matériel, de faire des dosages comparatifs chez d'autres serpents que la vipère. Vu la présence constante du zinc en quantité relativement abondante dans le venin des serpents, il serait cependant intéressant d'être fixé sur ce point; c'est une étude que nous nous proposons de poursuivre dès que nous en aurons les moyens.

Chez les batraciens et les poissons, dans les deux seuls dosages précis que nous ayons faits (grenouille et anguille), la teneur du sang en zinc s'est montrée sensiblement plus faible que chez les autres vertébrés. Comme il s'agit d'expériences

uniques, nous ne pourrions leur attribuer quelque signification qu'après les avoir confirmées et étendues.

Notre but essentiel n'étant, pour l'instant, que d'établir la constance du zinc dans le sang des vertébrés, il n'était pas utile de multiplier davantage les déterminations quantitatives. Ce sera l'objet de recherches ultérieures, de fixer exactement la manière dont se sérient les vertébrés, au point de vue de la teneur en zinc du sang et des organes, ainsi qu'on l'a fait partiellement pour le fer par exemple.

Tableau I.

ESPÈCE ANIMALE	POIDS du sang analysé à l'état		SO ⁴ Zn PESÉ	PROPORTION du Zn pour 1.000 de sang	
	Humide	Sec		Humide	Sec
	gr.	gr.	mgr.		
Homme	78,5	13,570	4	0,0206	0,120
Lapin	102,5	16,835	4,8	0,0190	0,116
Id.	98,2	16,150	5,5	0,0232	0,140
Id.	88,8	14,560	5,8	0,0261	0,161
Cobaye	95,2	16,730	4,1	0,0174	0,099
Chien	77,3	14,830	3,5	0,0184	0,095
Id.	79,1	15,250	4,4	0,0225	0,116
Cheval.	80,2	15,430	3	0,0151	0,084
Bœuf	77,5	13,790	4,1	0,0214	0,120
Hérisson	22,3	4,200	Présent.	Présent.	Présent.
Canard	80,8	14,170	4,6	0,0230	0,131
Poule	94,8	14,660	4,6	0,0197	0,127
Couleuvre à collier	30,5	5,175	2,1	0,0279	0,164
Vipère V. <i>Aspis</i>	31,3	5,207	2,5	0,0330	0,194
Id.	37,9	6,860	2,7	0,0290	0,159
Lézard vert	15,3	2,800	Présent.	Présent.	Présent.
Grenouille.	78,5	10,1	1,9	0,0098	0,076
Anguille.	72,7	11,8	2,3	0,0126	0,078

Il n'était pas sans intérêt de chercher à déterminer dans quelle partie du sang le zinc se trouve localisé. Est-il en solution dans le plasma? Ou fait-il au contraire partie constituante des éléments figurés, et dans ce cas, appartient-il au globule rouge ou au globule blanc, ou à l'un et à l'autre de ces éléments?

A la vérité, il serait difficilement concevable qu'aucune trace

de zinc ne se rencontrât, à aucun moment, dans le plasma sanguin. Même les éléments minéraux qui, comme le fer, sont essentiellement des constituants cellulaires — et nous verrons que c'est aussi le cas du zinc — doivent vraisemblablement emprunter le plasma sanguin comme véhicule, soit pour l'apport initial, soit pour des échanges ultérieurs. Mais ce qui est intéressant, c'est que le zinc, comme le fer, s'il existe dans le plasma, ne s'y rencontre qu'en très faible quantité. Nous l'avons établi par une série d'expériences dont voici deux types :

Expérience. — 108 grammes de sang de lapin, prélevés dans la carotide, sont reçus dans 108 grammes d'une solution de citrate de soude à 3 ‰ dissous dans l'eau salée à 8 ‰. Le mélange totalement incoagulable est porté aussitôt à la centrifuge, et la centrifugation est poussée jusqu'à ce que l'on ait obtenu une séparation nette du plasma et des éléments figurés. Le liquide, décanté, est soumis à une nouvelle centrifugation, suivie d'une nouvelle décantation. Le plasma et le culot globulaire, séparés, sont mis aussitôt à dessécher dans le vide sulfurique en vue de l'analyse. La quantité de sulfate de zinc obtenue avec le plasma n'a été que 0 milligr. 6 : soit, calculée en zinc et rapportée à 1.000 grammes de sang, 2 milligr. 2.

Comparée aux résultats du tableau précédent, relatifs à la teneur en zinc du sang total de lapin, cette analyse montre déjà que le plasma contient environ 10 fois moins de zinc que le sang total.

La plus grande partie de ce métal doit donc se trouver dans les éléments figurés, et effectivement c'est ce que montre la contre-partie de l'analyse précédente : dans le culot globulaire correspondant aux mêmes 108 grammes de sang, nous avons obtenu 5 milligr. 7 de sulfate de zinc, correspondant à 19 milligr. 1 de métal pour 1.000 grammes de sang total. Ce résultat a été pleinement confirmé par une expérience analogue faite avec le sang de vipère.

• *Expérience.* — 30 grammes de sang, provenant de 9 vipères saignées directement dans une éprouvette de centrifuge avec les précautions nécessaires pour éviter toute coagulation (1), sont centrifugés jusqu'à obtention d'un plasma parfaitement limpide. Le plasma, séparé des globules par décantation,

(1) Il n'est pas nécessaire, chez ces animaux, de citrater le sang pour obtenir la séparation du plasma et des éléments figurés. Nous avons montré antérieurement (*C. R. de la Soc. de Biologie*, 1897, p. 462) que le sang des vertébrés ovipares, à l'inverse de celui des mammifères, ne se coagule pas spontanément, quand on a soin de le recueillir en évitant le contact des tissus.

est soumis à une nouvelle centrifugation et les deux portions mises à dessécher séparément. L'analyse donne pour le plasma 0 milligr. 4 de sulfate de zinc, soit 0 milligr. 16 de zinc. Pour l'ensemble des éléments figurés on obtient par contre 4 milligr. 2 de sulfate de zinc, soit 1 milligr. 7 de zinc.

En ce cas par conséquent dix fois plus de zinc dans les globules que dans le plasma.

Voilà un premier point établi : la plus grande partie du zinc contenu dans le sang des vertébrés ne peut être que dans les éléments figurés. Sans parler des globulins, comment ce métal est-il réparti entre globules rouges et globules blancs ? Cette question est beaucoup plus délicate à résoudre.

Séparer parfaitement les globules rouges des leucocytes et obtenir, d'autre part, ces derniers sans globulins n'est pas, comme on le sait, chose bien facile. Les difficultés auxquelles nous nous sommes heurté en essayant de réaliser cette séparation nous empêchent, pour le moment, de donner à la question une réponse absolument définitive. Du moins sommes-nous en mesure d'établir expérimentalement que le zinc est un constituant des globules blancs, comme il est d'ailleurs, on le verra plus loin, un constituant des autres cellules, celles des organes et des tissus. Les leucocytes, à peu près purs, séparés du sang de cheval par le procédé d'Hekma (1), donnent en effet toujours à l'analyse des résultats positifs.

Expérience. — Plusieurs litres de sang de cheval, prélevé dans la jugulaire, sont reçus dans un volume égal d'une solution de citrate de soude à 5 ‰ dissous dans l'eau salée à 8 ‰, et le mélange est abandonné au repos pendant douze heures dans un endroit frais. Au bout de ce temps le plasma, à peu près libre des globules rouges qui se sont spontanément sédimentés, est siphonné. L'examen microscopique montre qu'il renferme encore, avec les globulins, un très grand nombre de globules blancs non déposés. Une courte centrifugation de ce plasma, suivie d'un lavage à l'eau citratée, donne un dépôt globulaire constitué, d'une façon presque exclusive, par des leucocytes. Outre quelques globules rouges, ce dépôt contient encore, cependant, un certain nombre de globulins dont on n'a pas pu éviter l'entraînement bien que la centrifugation fût peu énergique et de durée relativement courte. L'examen microscopique montre, de plus, quelques petits agglomérats de fibrine. Mis à dessécher, ce dépôt a donné un résidu sec de 1 gr. 1. L'analyse a permis d'y déceler 2 milligrammes de sulfate de zinc, soit 0 milligr. 8 de zinc environ pour 1 gramme de matière sèche.

Cette quantité est relativement considérable et — il n'est

(1) HEKMA : *Biochemische Zeitschrift*, II, p. 177, 1908.

pas inutile de le faire remarquer — sensiblement égale à celle que nous avons trouvée dans les organes les plus riches en zinc chez les mammifères : le cerveau et le thymus. Il est malheureusement impossible d'évaluer la masse de sang qui correspond à celle des leucocytes séparés par ce procédé; car de nombreux leucocytes échappent à la récolte, les uns parce qu'ils se sont déposés avec les globules rouges avant le siphonnage et les autres parce qu'ils n'ont pas le temps de se sédimenter au cours de la centrifugation, celle-ci ne pouvant être que très courte sous peine d'entraîner trop de globulins.

Il nous est donc impossible d'établir par différence la quantité de zinc qui revient aux globules rouges dans une masse de sang donnée; nous devons recourir à une épreuve directe, portant sur des globules rouges isolés aussi parfaitement que possible. Le seul procédé qui permette d'obtenir des globules rouges à peu près purs est la défibrination (qui entraîne la plupart des leucocytes), suivie de lavages répétés à l'eau salée physiologique.

L'expérience nous a montré que les globules rouges du sang de lapin, séparés par cette méthode, ne renferment qu'une très faible proportion de zinc.

Expérience. — 105 grammes de sang de lapin, pris dans la carotide, sont reçus dans un ballon renfermant des perles de verre, et défibrinés par battage. Le sang défibriné, filtré sur coton de verre, est lavé trois fois à la centrifuge avec de l'eau salée à 8 ‰. On a soin, à chaque décantation du liquide qui surnage, d'enlever la couche des éléments figurés qui se trouvent à la limite de séparation du liquide et du culot globulaire. Quand l'opération est terminée, celui-ci est mis à dessécher et le zinc y est recherché par la technique habituelle.

Dans le résidu sec du culot, correspondant approximativement à 95 grammes du sang primitif (on estime à 10 grammes environ les pertes produites au cours des manipulations), on ne trouve à l'analyse que 0 milligr. 9 de sulfate de zinc, correspondant à 0 milligr. 36 de zinc, soit le septième environ de la quantité obtenue dans les analyses faites antérieurement sur le sang total de lapin.

Ce résultat demande quelques commentaires. Le chiffre trouvé à l'analyse représente-t-il le zinc des globules rouges uniquement? le représente-t-il d'autre part en totalité?

Si faible que soit ce chiffre, il tend à pécher par excès, puisqu'un certain nombre de leucocytes restent mélangés aux

globules rouges et que ces leucocytes contiennent du zinc pour leur part. Ne serait-il pas possible, par contre, que le chiffre péchât par défaut? Les globules rouges soumis à l'analyse n'avaient-ils pas perdu quelque peu de leur zinc au cours des lavages qui leur avaient été imposés? Cette cause d'erreur est probablement minime. On sait, à la vérité, que les hématies, isolées du plasma et transportées dans des solutions salines, peuvent céder à ces dernières certains éléments minéraux très diffusibles. Mais le zinc n'est probablement pas dans ce cas : comme tous les métaux lourds, il doit former, avec les constituants organiques du protoplasma, des combinaisons ou des complexes qui ne lui permettent pas de traverser aisément les membranes. Et de fait nous verrons que le zinc, lié aux constituants organiques des venins, ne passe pas à la dialyse. Il faut convenir toutefois qu'une démonstration directe serait désirable.

Toujours est-il que le zinc, s'il existe dans les globules rouges des mammifères, s'y trouve certainement en bien moindre quantité que dans les leucocytes.

Si, après avoir établi la présence et le taux global du zinc dans le sang des vertébrés, nous avons cru devoir nous appesantir sur sa répartition, c'est que l'étude de cette question pouvait nous permettre d'en résoudre une autre, d'un intérêt plus général : le zinc est-il essentiellement un constituant cellulaire ou fait-il aussi partie, comme le sodium ou le calcium, des minéraux circulants? Il est intéressant de constater que les éléments figurés sont à peu près seuls à contenir du zinc, tandis que ce métal fait sensiblement défaut dans le plasma, dans l'humeur qui représente véritablement le milieu intérieur : le zinc est bien un *constituant cellulaire* essentiellement.

Cette conclusion se renforce si nous considérons le taux de partage du zinc entre les leucocytes, qui en renferment relativement beaucoup, et les globules rouges, qui en contiennent peu. Il faut noter, en effet, que dans les globules rouges, surtout chez les mammifères, l'hémoglobine constitue presque toute la masse, tandis que la substance cellulaire proprement dite n'en représente qu'une portion minime : tout au plus un dixième.

CHAPITRE IV

LE ZINC DES ORGANES ET DES TISSUS DANS LA SÉRIE ANIMALE

Le zinc des organes et des tissus dans la série animale. — Les Mammifères.
— Les Vertébrés ovipares. — Les Invertébrés. — Le zinc dans l'œuf, le lait et quelques autres sécrétions.

Nous avons établi, par l'étude du sang, que la présence du zinc est constante chez tous les vertébrés, et que, dans le sang, ce métal est à peu près réservé aux éléments cellulaires. Nous devions alors nous demander si la même constance ne se manifesterait pas pour tous les organes et dans toute la série zoologique.

Il importait, pour élucider cette question, d'étendre nos recherches à un nombre d'espèces et d'organes suffisant pour nous autoriser à une conclusion générale. Des raisons de commodité nous ont naturellement conduit à utiliser de préférence des animaux que nous avons assez facilement à notre disposition et à faire plutôt choix des organes assez volumineux pour nous permettre des dosages. Dans certains cas, cette dernière condition n'ayant pu être remplie, nous avons dû, ou bien réunir plusieurs organes empruntés à divers individus, ou bien nous contenter de vérifier simplement la présence du zinc; en règle générale il faut disposer de 5 à 20 grammes de matière sèche, soit 25 à 100 grammes d'organes frais, pour obtenir des déterminations pondérables.

Pour éliminer le sang autant que possible, nous saignons nos animaux à blanc. Les organes étaient immédiatement broyés et desséchés dans le vide, puis conservés en tubes scellés pour être traités ultérieurement.

Reste à exposer nos résultats. Nous les rapporterons sous forme de tableaux, en passant successivement en revue les mammifères, les autres vertébrés et les invertébrés. En dernier

lieu, nous signalerons les quelques données que nous avons recueillies sur l'œuf, sur la sécrétion lactée et sur quelques autres sécrétions.

Dans le dépouillement de nos analyses nous devons tout d'abord chercher, puisque tel est notre but principal, jusqu'à quel point le zinc est un constituant cellulaire constant dans toute la série animale. Or un simple coup d'œil, jeté sur les tableaux ci-après, suffit à montrer que cette constance s'est vérifiée sans aucune exception.

Quant à fixer l'ordre dans lequel, au point de vue de la richesse en zinc, les organes se rangent les uns par rapport aux autres, soit dans une espèce donnée, soit dans l'ensemble de la série animale, nous n'y saurions prétendre, sauf peut-être pour quelques-uns d'entre eux.

Nous nous contenterons de donner, à cet égard, de rapides aperçus; dans les commentaires très brefs dont nous accompagnerons l'exposé de nos données analytiques, celles-ci formant l'essentiel de ce chapitre, documentaire avant tout.

Mammifères. — Chez les mammifères, nous avons recherché et presque toujours dosé le zinc dans la plupart des organes et dans quelques tissus. Nous l'avons trouvé de façon constante, presque toujours en quantité notable et souvent en forte proportion. Cette proportion va jusqu'à atteindre dans certains organes, tels que les centres nerveux et le thymus, 1 décigramme environ par kilogramme, soit près de 1/10.000^e du poids frais. Ce taux du zinc paraîtra vraiment élevé, si l'on considère qu'il correspond sensiblement au taux du fer contenu normalement dans le foie de quelques mammifères et qu'il est très supérieur au taux moyen du fer dans les autres organes.

Parmi les organes les moins riches, au contraire, il faut mentionner la rate, le muscle et la thyroïde, dont la teneur en zinc oscille en moyenne entre 1/40.000^e et 1/60.000^e. Dans l'intervalle se placent le foie, le pancréas, le rein, la muqueuse duodénale, etc. Il est bon de faire remarquer que le foie est, après le cerveau et le thymus, l'organe qui se montre habituellement le plus riche.

Notons que le zinc n'existe qu'en faible proportion dans le

tissu osseux et le tissu cartilagineux; quant au tissu adipeux, il n'en renferme que des traces extrêmement minimes; mais rappelons en même temps que ces divers tissus sont peu fournis de substance cellulaire active.

Tableau II.

ORGANES	ESPÈCE ANIMALE	POIDS de matière analysée à l'état		SO ⁴ Zn	PROPORTION de Zn pour 1.000 de matière		
		Humide	Sec		Pesé	Humide	Sèche
		gr.	gr.	mgr.			
Cerveau	Chien.	74,23	19,625	16,9	0,092	0,348	
Id.	Id.	52,30	11,230	11,3	0,087	0,407	
Thymus	Bœuf.	75,88	18,830	18,7	0,099	0,402	
Id.	Id.	43,60	9,240	7,9	0,073	0,346	
Foie	Lapin.	62,71	15,462	6,9	0,045	0,180	
Id.	Id.	37,43	9,112	4,4	0,048	0,195	
Id.	Chien.	63,65	18,725	5,7	0,036	0,123	
Id.	Bœuf.	36,28	11,050	3,9	0,043	0,142	
Pancréas	Chien.	21,30	5,90	2,6	0,048	0,178	
Id.	Bœuf.	64,6	12,8	3,8	0,023	0,120	
Rein	Lapin.	63,80	13,230	7,2	0,043	0,220	
Id.	Chien.	74,20	15,400	5,6	0,030	0,146	
Rate	Chien.	22,80	4,68	1,3	0,023	0,112	
Id.	Id.	65,42	12,23	4,8	0,029	0,158	
Muqueuse duodénale .	Chien.	38,25	7,20	2,8	0,029	0,157	
Muqueuse gastrique .	Chien.	24,30	5,050	1,1	0,018	0,088	
Muscle	Lapin.	62,65	15,28	3,2	0,020	0,084	
Id.	Chien.	58,30	12,40	3	0,020	0,098	
Id.	Bœuf.	46,75	9,50	2,8	0,021	0,119	
Thyroïde	Cheval.	51,20	12,80	2,2	0,017	0,069	
Poumon	Cheval.	Pertes	?	Présent	Présent	Présent	
Epiderme	Homme.	—	4,65	3,2	—	0,279	
Cheveux	Id.	—	11,8	7	—	0,240	
Crins	Cheval.	—	8,44	5,3	—	0,254	
Poils	Id.	—	4,15	2,9	—	0,283	
Sabots	Id.	—	11,30	4,4	—	0,157	
Tissu osseux	Bœuf.	—	8,20	Présent	—	Présent	
Cartilage	Id.	—	6,55	Id.	—	Id.	
Tissu adipeux	Id.	—	12,80	Traces	—	Traces	

Une place à part doit être faite à l'épiderme et à ses dérivés : les phanères. Dans les cheveux, les poils ou les crins, dans les sabots, les ongles ou les cornes, aussi bien que dans l'épiderme lui-même, le taux du zinc, rapporté au poids de matière sèche (seule évaluation possible dans ce cas particulier), s'est montré relativement élevé. Il est curieux que ces productions, dont l'activité physiologique est pourtant nulle ou insignifiante et

qui sont comparables à des déchets, se trouvent être souvent plus riches en zinc que certains organes fonctionnellement très actifs, tels que le muscle.

Faut-il supposer que la peau et ses annexes sont des voies d'élimination du zinc? L'hypothèse est des plus vraisemblables. On sait, en effet, que la peau et les phanères jouent précisément un rôle d'excrétion vis-à-vis de certains métalloïdes et de divers métaux, appartenant normalement à l'organisme, ou accidentellement introduits.

Enfin il est une donnée que nous avons déjà signalée plus haut et sur laquelle nous croyons devoir insister. Deux organes, avons-nous dit, se distinguent par leur teneur particulièrement élevée en zinc : les centres nerveux et le thymus. Or chacun d'eux présente une caractéristique biochimique importante à souligner : le tissu nerveux est, de tous les tissus de l'organisme, le plus riche en phosphatides; quant au thymus, c'est l'organe qui renferme la plus grande quantité d'acide nucléique. Nous aurons à utiliser ces rapprochements quand nous étudierons, plus loin, le rôle physiologique du zinc vis-à-vis de ces deux ordres de substances (V. tableau II).

Vertébrés ovipares. — Chez les vertébrés ovipares, la recherche du zinc dans les organes ne pouvait, pour des raisons pratiques, être poursuivie systématiquement dans chaque classe. Cela importait peu d'ailleurs, notre seul but immédiat étant d'établir, par un certain nombre d'exemples, la présence constante et générale du zinc dans les organes de ces animaux, sans vouloir préciser l'ordre de répartition.

Les analyses sont résumées dans le tableau III.

Certains résultats appellent quelques réflexions.

Tout d'abord nous retrouvons, pour les quelques organes que nous avons eu l'occasion d'analyser dans cette série, la même hiérarchie que chez les mammifères, au point de vue de la richesse relative en zinc.

C'est ainsi que chez les oiseaux — autant qu'il nous est permis de nous appuyer sur un seul exemple, celui du canard — nous avons trouvé le foie notablement plus riche que les muscles.

Ainsi encore, chez les reptiles qu'il nous a été possible d'utiliser pour des analyses quantitatives, nous avons constaté qu'au même point de vue, le foie l'emporte toujours sur le muscle et que le rein, comme chez les mammifères, occupe une place intermédiaire.

Tableau III.

ORGANES	ESPÈCES ANIMALES	POIDS de matière analysée à l'état		SO ⁴ Zn PESÉ	PROPORTION de Zn pour 1.000 de matière	
		Humide	Sec		Humide	Sèche
	<i>Oiseaux :</i>	gr.	gr.	mgr.		
Foie . . .	Canard	13,850	4,725	2,3	0,067	0,197
Id. . . .	Id.	45,180	10,100	8,5	0,076	0,341
Muscle . .	Id.	36,500	9,460	2,4	0,027	0,102
Plumes . .	Id.	—	11,200	3,8	—	0,137
	<i>Reptiles :</i>					
Foie . . .	Couleuvre à collier.	33,750	8,600	2,9	0,034	0,136
Id. . . .	Vipère (V. <i>Aspis</i>).	54,440	13,450	6,8	0,050	0,204
Id. . . .	Id.	23,010	5,630	3,1	0,053	0,223
Rein . . .	Id.	13,600	3,125	1,2	0,035	0,155
Muscles. .	Id.	72,200	15,250	6,5	0,030	0,172
Peau . . .	Couleuvre.	—	8,380	5,4	—	0,261
Id. . . .	Vipère (V. <i>Aspis</i>).	—	9,650	4,8 *	—	0,201
Id. . . .	Lézard.	—	1,850	Présent	Présent	Présent
Ecaille . .	Tortue.	—	2,150	Présent	—	Présent
	<i>Batraciens :</i>					
Foie . . .	Grenouille.	36,250	10,630	1,9	0,021	0,072
Muscle . .	Id.	39,860	8,285	1,4	0,014	0,068
Peau . . .	Id.	—	9,225	5,9	—	0,259
Id. . . .	Crapaud.	—	?	Présent	—	Présent
	<i>Poissons :</i>					
Foie . . .	Anguille.	59,80	14,800	11	0,073	0,301
Muscle . .	Id.	61,30	12,630	3,3	0,021	0,105
Rate . . .	Id.	7,280	1,5	Présent	Présent	Présent
Peau . . .	Id.	—	3,200	Présent	—	Présent

Chez la grenouille et surtout chez l'anguille, qui seules, dans nos déterminations quantitatives, représentent respectivement les batraciens et les poissons, la prépondérance du foie sur le muscle s'est à nouveau montrée évidente. L'anguille, soit dit en passant, nous a donné, pour le foie, la teneur en zinc la plus élevée que nous ayons obtenue chez les vertébrés à sang froid; notons en même temps que le foie de l'anguille est particulièrement riche en phosphatides.

Nous ajouterons que chez les vertébrés ovipares, comme chez les mammifères, la peau et tout particulièrement ses annexes épidermiques se sont montrées relativement riches en zinc.

Une dernière remarque : étant donnée l'abondance du zinc dans les venins des serpents, on aurait pu s'attendre à le trouver en forte proportion dans les organes de ces animaux. Or cette prévision ne s'est pas réalisée, du moins pour la vipère, seul ophidien venimeux que nous ayons examiné à ce point de vue : le tissu hépatique de ce reptile renferme moins de zinc que celui du canard ou de l'anguille, et ses muscles sont à peine plus riches que ceux des mammifères.

Invertébrés. — Chez les invertébrés, notre étude s'est limitée à un petit nombre d'espèces, choisies de préférence parmi celles qui appartiennent aux groupes les plus élevés en organisation et chez lesquelles les organes, mieux différenciés, sont, par le fait même, plus faciles à obtenir isolément.

Ceux qui sont au bas de l'échelle zoologique ont paru *a priori* moins bien appropriés au but principal que nous avions en vue : à elle seule, la simple constatation du zinc, chez de tels animaux n'eût pas été pleinement significative. En effet, ces êtres sont mal fermés au milieu extérieur, qui les pénètre plus ou moins ; or ce milieu, et notamment l'eau de mer, habitat de la plupart d'entre eux, renferme notoirement du zinc, à l'état de traces il est vrai.

Même chez les mollusques et les crustacés, dont le milieu intérieur est relativement fermé, nous avons, pour éviter toute objection, examiné des espèces d'eau douce et d'autres exclusivement terrestres concurremment aux espèces marines.

Chez ces animaux, dont le développement est d'ordinaire suffisant pour permettre d'examiner isolément quelques organes ou tissus, nous avons recherché le zinc tout particulièrement dans l'hépatopancréas et les muscles.

Chez les insectes, les arachnides, les annélides et les échinodermes, les espèces que nous avons eu à notre disposition ne nous ont permis qu'un examen global de l'animal entier.

Dans tous les cas, qu'il se soit agi de l'animal total ou d'organes séparés, nous avons toujours pu manifester la présence du zinc.

Quelques dosages nous ont même montré, dans les organes des mollusques et des crustacés, des quantités de zinc généralement beaucoup plus grandes que dans les organes correspondants des vertébrés. L'hépto-pancréas peut renfermer, chez certains de ces animaux, une proportion de zinc plusieurs fois supérieure aux maxima que nous avons enregistrés chez les vertébrés, soit dans le foie, soit dans le pancréas. Le taux du zinc dans le muscle est toujours plus élevé également que chez les vertébrés; le muscle du tourteau et celui de l'écrevisse, par exemple, peuvent contenir de trois à quatre fois plus de zinc que les muscles des mammifères ou des oiseaux.

Les chiffres du tableau IV donnent la proportion de zinc uniquement rapportée à la quantité de matière sèche mise en œuvre.

Tableau IV.

ORGANES	ESPÈCE ANIMALE	POIDS de matière sèche analysée	SO ⁴ Zn PESÉ	PROPORTION de Zn p. 1.000
	<i>Mollusques :</i>	gr.	mgr.	
Hépto-pancréas.	Escargot (<i>Helix Pom.</i>) . .	6,750	6,1	0,366
Id.	Ricarde (<i>Pecten Jacob.</i>) . .	8,400	9,1	0,439
Muscle.	Id.	13,650	4,3	0,127
Animal total. . .	Moule (<i>Mytilus Edulis</i>) . .	14,500	3,8	0,106
	<i>Crustacés :</i>			
Hépto-pancréas.	Tourteau (<i>Cancer pag.</i>) . .	13,200	5,3	0,162
Muscle.	Id.	10,500	9,2	0,355
Id.	Écrevisse (<i>Astacus fluv.</i>) . .	4,090	2,8	0,277
	<i>Insectes :</i>			
Animal total. . .	Carabe (<i>Carabus aureus</i>) . .	11,580	5,2	0,181
Id.	Mouche (<i>Musca domest.</i>) . .	2,350	Présent.	Présent.
	<i>Arachnides :</i>			
Id.	Araignée (<i>Tegenaria vulg.</i>) .	1,860	Présent.	Présent.
	<i>Annélides :</i>			
Id.	Sangsue (<i>Hirudo officin.</i>) .	3,220	Présent.	Présent.
	<i>Échinodermes :</i>			
Id.	Oursin (<i>Eschinus escul.</i>) . .	4,300	Présent.	Présent.

Le zinc dans l'œuf, dans la sécrétion lactée et dans quelques autres sécrétions. — Si le zinc est un élément essentiel de l'organisme animal et si sa présence dans la cellule est physiologi-

quement nécessaire, il faut, sans contredit, que ce métal existe dans l'œuf, chez les ovipares, pour assurer le développement de l'embryon. Nous avons néanmoins jugé bon de vérifier cette présomption par quelques recherches complémentaires.

Nous avons pu constater qu'en fait le zinc, comme le fer, est toujours présent dans l'œuf des oiseaux. Dans l'œuf de poule, où nous l'avons dosé spécialement, son taux atteignait à peu près la moitié du taux moyen qu'on assigne au fer : plusieurs analyses nous ont donné des chiffres variant entre 1 milligramme et 1 milligr. 25 de zinc pour un œuf de 60 grammes environ.

Nous avons trouvé également ce métal dans l'œuf de la couleuvre et dans celui de la vipère. Des œufs de vipère, non encore développés, nous ont donné un chiffre de zinc qui, rapporté au poids de matière sèche, s'est montré sensiblement supérieur au chiffre relevé chez les oiseaux.

Les mêmes considérations nous ont conduit à rechercher le zinc dans le lait. Nous avons pu nous assurer que dans cette sécrétion, indispensable au développement des jeunes mammifères, le zinc est aussi toujours présent.

Sa quantité, évaluée dans le lait de vache, nous a paru assez voisine de 2 milligrammes par litre; rappelons que la quantité moyenne de fer contenue dans le même lait est évaluée habituellement à 5 milligrammes environ.

Il était intéressant de rechercher le zinc dans d'autres sécrétions, d'autant plus qu'on pouvait se demander si l'une d'elles ne constituerait pas, pour ce métal, une voie importante d'élimination.

Pratiquement, nous ne pouvions guère utiliser à cet effet que des sécrétions de mammifères.

Le venin de serpent contenant, comme nous le verrons, une proportion de zinc très considérable et les glandes salivaires, spécialement la parotide, représentant, chez les mammifères, les homologues des glandes venimeuses des reptiles, un intérêt particulier s'attachait à l'examen de la salive.

Pour obtenir ce liquide dans des conditions aussi rapprochées que possible des conditions physiologiques, nous nous sommes adressé à la sécrétion parotidienne du cheval, obtenue

par fistule, au cours de la mastication, suivant le procédé classique. Chose assez étonnante, même dans 110 centimètres cubes de salive, nous n'avons pu déceler aucune trace de zinc. C'est même le seul cas où un produit organique animal nous ait donné un résultat absolument négatif.

Nous avons pu déceler ce métal, par contre, dans les autres sécrétions où nous l'avons recherché, mais nous ne l'y avons habituellement rencontré qu'en très faible quantité.

Ainsi dans le suc pancréatique (suc de sécrétine) et dans la bile, nous l'avons toujours constaté; bien qu'il n'y fût jamais qu'en assez faible proportion, il nous suffisait néanmoins de 20 à 30 centimètres cubes de liquide, au plus, pour le révéler. Je note en passant que les sucs pancréatiques les plus riches en zinc ont été ceux où j'ai vérifié que les éléments cellulaires étaient le plus nombreux.

Le suc intestinal (obtenu par fistule de Thiry), débarrassé par centrifugation des nombreuses cellules qu'il contient toujours, nous a montré, lui aussi, des traces de zinc.

Enfin on en peut déceler dans l'urine, à condition, il est vrai, d'opérer sur des volumes assez grands.

En somme, présence du zinc, en quantités faibles toutefois, dans toutes les sécrétions que nous avons examinées, la salive exceptée. Il n'est pas superflu de noter qu'ici comme dans le sang, c'est dans les cellules ou les débris cellulaires, quand il en existe en suspension, que le zinc semble dominer.

Nous avons commenté au cours de ce chapitre, purement documentaire, certains faits qui nous ont paru intéressants, concernant les variations du zinc d'un organe à l'autre et à divers échelons de la série zoologique. Mais la conclusion essentielle de ce chapitre, c'est que, dans tous les organes, chez tous les animaux, nous avons trouvé du zinc en notable proportion.

Nos recherches, bien qu'assez étendues, ne nous ayant mis en présence d'aucune exception, il nous paraît difficile d'échapper à cette conviction, que *le zinc est bien un constituant constant de toute cellule animale.*

CHAPITRE V

LE ZINC DES VENINS DE SERPENTS

Constance du zinc dans les venins. — Sa quantité relativement très élevée. — Les Colubridés et les Vipéridés. — Expériences montrant que le zinc est dissimulé dans les venins. — Teneur élevée des venins en soufre. — Rapport quantitatif du zinc et du soufre.

La constitution chimique des venins de serpents est encore très obscure. On sait depuis longtemps, il est vrai, que les venins, comme d'autres produits de sécrétion glandulaire, renferment une très forte proportion de matières protéiques, associées à une petite quantité de graisses et d'hydrate de carbone. On sait aussi que ces matières protéiques présentent des caractères assez différents dans les diverses catégories de venins; mais, à bien des égards, on est mal fixé sur leur nature. Il paraît établi cependant que, dans le venin de cobra, type des venins de Colubridés, les substances protéiques sont représentées, presque exclusivement, par des matières albuminoïdes appartenant au groupe des protéoses (1), auxquelles sont adjointes des globulines en faible proportion. Ces venins, soumis à l'action de la chaleur, donnent un coagulum peu important, et ne sont que très partiellement précipités par la dialyse ou l'addition de sulfate de magnésie à saturation.

Les venins de Vipéridés, au contraire, sont, pour la plupart, relativement riches en substances albuminoïdes coagulables par la chaleur (globulines et albumines) et ils donnent, généralement, un abondant précipité, lorsqu'ils sont soumis à la dialyse ou à l'action des sels en solution concentrée.

Il est à noter que les premiers sont très résistants à l'action

(1) Ces données résultent spécialement des travaux de WEIR MITCHELL et REICHERT, de ceux de WOLFENDEN, de KANTHACK et de MARTIN.

destructive de la chaleur et qu'il faut, en général, atteindre une température égale, sinon supérieure, à 100° pour faire disparaître complètement leurs propriétés, alors qu'il suffit de chauffer les seconds à 70-75°, pendant un temps relativement court, pour supprimer presque entièrement la plupart de leurs actions physiologiques.

Ces actions, d'ailleurs, considérées dans leur ensemble, sont assez distinctes dans les deux catégories de venins. Non seulement elles se différencient par leur intensité, mais elles présentent des caractères propres, qu'il est intéressant de rappeler.

Injectés aux animaux, les venins de Colubridés, quelle que soit leur voie de pénétration, se montrent essentiellement neurotoxiques; ils ne déterminent pas de lésions locales et n'altèrent que très faiblement les humeurs. Les venins de Vipéridés, par contre, très peu neurotoxiques, agissent principalement sur les éléments avec lesquels ils prennent immédiatement contact : inoculés sous la peau, ils déterminent *in situ* des lésions plus ou moins étendues; injectés dans le sang, ils produisent des thromboses ou provoquent des hémorragies (1).

Les auteurs qui ont cherché à déterminer la nature et la composition des substances auxquelles sont liées ces diverses actions ne nous ont apporté, jusqu'ici, que des données imprécises ou des plus discutables. La plupart, cependant, sont d'accord pour admettre que les actions neurotoxiques sont plus particulièrement le fait des constituants protéosiques, alors que les actions sur les humeurs ou sur les tissus devraient être rapportées, soit aux albumines proprement dites, soit aux globulines.

Il est vrai que Faust (2) a cru séparer, de divers venins, et en particulier du venin de cobra, un principe chimiquement défini, l'ophiotoxine, qui, d'après lui, ne serait autre que le poison neurotoxique. L'ophiotoxine de Faust, substance ter-

(1) On trouve l'exposé détaillé de tous ces faits dans les ouvrages de CALMETTE (Les venins, les animaux venimeux et la sérothérapie antivenimeuse, Paris, Masson, 1907) et de H. NOGUCHI (Snake venoms, publication of the Carnegie Institution; Washington 1909).

(2) E. S. FAUST: Ueber Ophiotoxin aus dem Gifte der Ostende'schen Brillenschlange Cobra di Capello (*Naja tripudians*), Leipzig 1907, 24 p.

naire, de la nature des glucosides, aurait une constitution rappelant celle des sapotoxines. Mais ces recherches n'ont jamais été vérifiées, et nous-même (1) n'avons pu réussir, en répétant les expériences dans des conditions qui excluent la possibilité d'altérations microbiennes, à obtenir la substance que Faust avait isolée.

Si l'attention des chercheurs a été retenue par l'étude des constituants organiques des venins, elle ne s'est jamais fixée, jusqu'ici, sur celle de leurs constituants minéraux.

Tout au plus savait-on que les venins ne laissent, à l'incinération, qu'une minime quantité de cendres, où l'on n'a signalé que les éléments dont la présence est banale dans tous les liquides organiques.

Des données nouvelles, dont on saisira plus loin la portée, devaient nous conduire à reprendre systématiquement l'étude, à peine ébauchée, des constituants minéraux des venins.

Nous avons observé en effet que, parmi les actions caractéristiques de ces poisons, il en est qui sont incontestablement de nature diastasique. Or, les travaux de ces dernières années avaient montré, à la suite des recherches initiatrices de Gabriel Bertrand sur les oxydases, quelle importance il fallait attribuer, dans les actions des diastases, aux éléments minéraux qui les constituent ou qui leur sont simplement accouplés.

Les actions diastatiques des venins, celles du moins qui leur sont propres et dont dépendent quelques-uns de leurs effets les plus curieux, n'étaient-elles pas subordonnées, elles aussi, à la présence d'un élément minéral particulier? Pour vérifier cette hypothèse, il fallait reprendre tout d'abord l'étude des constituants minéraux des venins et refaire soigneusement l'analyse des cendres.

En raison des petites quantités de matière dont nous disposions à l'origine, nous nous résolûmes, ne fût-ce que pour orienter les recherches chimiques ultérieures, à soumettre tout d'abord à l'examen spectrographique les cendres de quelques venins.

Avec l'aide de M. A. de Gramont, qui nous a fait très obli-

(1) C. f. C. DELEZENNE et S. LEDEBT in *Thèse de doctorat Sciences naturelles* S. Ledebt. Paris 1911.

geamment bénéficier de sa haute compétence dans cette recherche délicate, nous eûmes la satisfaction de voir se vérifier immédiatement le fait essentiel qui allait fournir à notre hypothèse son premier point d'appui. Les cendres de trois venins différents examinés successivement (cobra, bungare, céraste) nous montrèrent dans le spectre des raies caractéristiques, décelant la présence, en assez forte proportion, d'un métal non relevé jusque-là : le zinc.

Ce résultat fut corroboré par l'analyse chimique à laquelle nous soumîmes immédiatement les mêmes venins. L'analyse, faite d'abord sur le résidu obtenu par incinération, nous montra que le zinc se trouvait effectivement dans ces venins en quantité considérable. Dans le venin de cobra par exemple, nous obtenions pour 1 gramme de venin sec, laissant à la calcination 27 milligrammes de cendres, 5 milligr. 3 d'oxyde de zinc, soit près de 20 % de la masse totale des cendres, dans lesquelles on ne trouvait d'ailleurs, à côté du zinc, que de la soude, de la potasse, de la chaux et de la magnésie.

Nous étant rendu compte que, malgré toutes les précautions, l'incinération donnait des pertes, nous lui substituâmes invariablement, dans la suite, la destruction de la matière organique par voie chimique, en utilisant la méthode de Neumann. Toutes les données dont nous aurons à faire état se rapportent exclusivement à des résultats obtenus par l'emploi de ce procédé.

Nous avons étendu nos recherches à un grand nombre de venins, et répété plusieurs fois les analyses pour quelques-uns d'entre eux, dont nous avons pu réunir des quantités assez grandes.

Les venins utilisés avaient été, en bonne partie, recueillis par nous-même sur des serpents envoyés directement au laboratoire de physiologie de l'Institut Pasteur; d'autres avaient été mis à notre disposition par plusieurs de nos collègues français et étrangers (1), qui avaient bien voulu se charger d'en faire la récolte. d'après nos indications.

(1) Je dois remercier tout spécialement, à cet égard, MM. Calmette, Ch. Nicolle, E. Sergent, V. Brazil, Wilson, Denier, Bouet, Léger, Guyenot, Chatton, qui ont bien voulu nous procurer les serpents dont nous avions besoin ou se charger eux-mêmes de la récolte des venins.

Les venins étaient prélevés sur les ophidiens vivants, par expression des glandes ; ils étaient reçus dans de petits cristalliseurs stériles et mis aussitôt à dessécher dans le vide sulfurique ou sur le chlorure de calcium. Le résidu sec était conservé en tubes de verres scellés, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment de l'analyse. Avant de procéder à celle-ci, on prélevait la quantité voulue, on la pulvérisait et on avait soin d'en achever la dessiccation jusqu'à constance de poids.

Avec les venins particulièrement riches en zinc, 2 à 3 décigrammes de venin sec suffisaient habituellement pour un dosage précis ; en général, toutefois, il nous a été possible d'en utiliser des quantités notablement plus grandes. Avec les venins les plus pauvres, il fallait employer au moins 0 gr. 5 à 1 gramme.

La proportion de zinc obtenue a toujours été exclusivement rapportée au venin considéré à l'état sec. D'ailleurs, cette évaluation, qui était la seule pratiquement possible — nombre de venins n'ayant pas été pesés aussitôt après la récolte — était aussi la seule qu'il importait d'établir, puisqu'elle exprimait le rapport du zinc à la quantité de matière fixe contenue dans les venins, et ceci indépendamment des variations, essentiellement contingentes, de leur richesse primitive en eau.

Les résultats de nos analyses sont consignés dans le tableau V ci-contre. Les venins y sont classés selon leur teneur respective en zinc.

La première donnée qui semble bien se dégager de ces recherches, c'est que le zinc est un élément constant des venins des serpents et qu'il s'y trouve toujours en *proportion relativement considérable*.

Si l'on passe en revue les chiffres de nos analyses quantitatives, qui ont porté sur 14 venins d'espèces différentes, on voit que les plus pauvres en zinc en renferment encore plus de 1 ‰ ; ceux qui en sont le plus abondamment fournis peuvent en contenir de 5 à 6 ‰. Cette quantité paraîtra certainement très élevée si nous rappelons que, dans la substance animale de beaucoup la plus riche en fer, l'hémoglobine, ce métal existe en proportion qui ne dépasse sensiblement pas 3,3 ‰.

Une autre donnée qui mérite également d'être soulignée et

sur laquelle nous aurons à revenir, c'est que les venins se rangent, au point de vue de leur teneur en zinc, en deux catégories. Or, par une concordance remarquable, cette séparation en deux groupes se superpose précisément au classement zoologique des ophidiens venimeux : dans le venin des Colubridés, beaucoup de zinc; dans celui des Vipéridés, relativement peu. On sait au surplus — nous l'avons rappelé déjà —

Tableau V.

VENINS	POIDS du venin sec analysé	SO ⁴ Zn PESÉ	PROPORTION de Zn pour 1.000
Colubridés :	gr.	mgr.	
<i>Naja tripudians</i> (Cobra)	0,990	13,7	5,6
Id.	0,990	13,2	5,4
Id.	1,122	14,4	5,2
Id.	0,830	10,2	4,9
<i>Naja haje</i>	0,350	3,7	4,2
<i>Bungarus caeruleus</i>	0,872	9,4	4,3
Id.	0,900	9,5	4,2
<i>Sepedon</i>	0,468	3,9	3,3
<i>Hoplocephalus variegatus</i>	0,698	5,6	3,2
<i>Naja nigricollis</i>	0,375	2,9	3,1
Vipéridés :			
<i>Cerastes cornutus</i>	0,850	4,9	2,3
Id.	0,925	4,8	2,1
<i>Cerastes vipera</i>	0,600	3,3	2,2
<i>Bothrops lanceolatus</i>	0,750	3,5	1,9
<i>Trimeresurus riukianus</i>	0,503	2,1	1,7
<i>Vipera lebetina</i>	0,480	1,5	1,3
<i>Vipera aspis</i>	0,885	2,9	1,3
Id.	0,760	2	1,1
<i>Bitis gabonica</i>	0,570	1,7	1,2
<i>Bitis arietans</i>	0,635	1,7	1,1

que ces deux groupes se distinguent également par l'intensité et la nature des effets que produisent leurs venins.

A cette règle nous n'avons du moins trouvé aucune exception. Dans la première série figurent bien exclusivement les venins des Colubridés : leur teneur en zinc a varié entre 5,6 et 3,1 ‰ et il est à remarquer que le venin de cobra indien, qui est le plus toxique, est aussi celui dont le taux a été le plus élevé. Dans la seconde série, par contre, nous ne trouvons que

des venins de Vipéridés, avec une teneur en zinc notablement plus faible : 2,3 à 1,2 ‰. Notons que les plus pauvres, ceux de *Vipera Aspis* et de *Bitis arietans*, qui renferment près de 5 fois moins de zinc que le venin de cobra, sont, de tous les venins étudiés, ceux que l'on considère généralement comme les moins toxiques. Nous verrons plus loin, d'ailleurs, dans quelles conditions et dans quelle mesure la relation que nous venons de signaler peut être précisée.

Après avoir établi la constance du zinc dans le venin des serpents, la première question que nous avions à résoudre était de savoir si ce métal s'y trouve sous la forme d'un sel ou s'il est assez profondément engagé dans une molécule organique complexe pour être complètement « dissimulé » aux réactifs, comme le fer dans l'hémoglobine, par exemple. Pour nos recherches sur ce point, nous avons utilisé uniquement le venin de cobra.

Deux ordres de faits concordants nous permettent d'affirmer que, dans la sécrétion venimeuse, le zinc est bien lié aux constituants organiques et non pas simplement éliminé sous la forme d'un sel minéral tel qu'un chlorure, un sulfate ou un acétate.

Le zinc du venin de cobra, en effet, n'est pas précipitable par l'hydrogène sulfuré et n'est pas séparable par la dialyse. Nous pouvons ajouter que la combinaison dans laquelle ce métal est engagé est assez stable pour ne pas être dissociée par l'acide chlorhydrique, même au titre de 4 ‰. Une solution de venin de cobra, mise aseptiquement à dialyser en présence d'un volume considérable de la solution d'HCl, conserve, pour ainsi dire intégralement, le zinc qu'elle renfermait primitivement, même quand l'opération de la dialyse est prolongée et le liquide extérieur fréquemment renouvelé.

Dans une expérience, avec un venin qui renfermait primitivement 12 milligr. 6 ‰ de zinc, nous avons obtenu 10 milligr. 9 après une dialyse de 3 jours. Notons combien cet écart est minime, et ajoutons qu'il ne démontrerait pas qu'une fraction même très faible du zinc ait été libérée par HCl. Il est bien connu, en effet, que les venins, et tout spécialement ceux qui sont riches en protéoses, comme le venin de cobra, peuvent traverser les

membranes ; et en effet nous avons pu nous assurer que, dans nos expériences, une petite portion du venin total se retrouvait toujours dans le liquide extérieur, à la fin de la dialyse.

S'il est hors de doute que le zinc est organiquement lié dans le venin, il est plus difficile de déterminer la nature de la substance dont ce métal est un des éléments constitutifs ou à laquelle il est tout au moins très intimement associé. S'agit-il d'une substance protéique ? Oui, vraisemblablement, puisque, d'une part, les venins sont essentiellement constitués par des substances de cet ordre, et que l'on sait, d'autre part, avec quelle facilité certaines matières protéiques s'unissent aux métaux ou à leurs sels pour former des combinaisons ou des complexes dans lesquels le métal est totalement dissimulé.

Tel est le cas de l'hémoglobine, tel est aussi celui des complexes protéosiques que la chimie sait depuis longtemps réaliser. Comme les venins renferment précisément des substances du groupe des protéoses, n'est-ce pas à elles que le zinc serait uni ? On serait d'autant plus porté à le supposer que les venins les plus riches en zinc sont aussi ceux qui paraissent les plus riches en protéoses. Nous avons rappelé plus haut que le venin de cobra (et il en est de même de la plupart des venins de Colubridés) est un de ceux que l'on considère comme ayant la teneur la plus élevée en protéoses ; il est justement aussi celui dans lequel le zinc est le plus abondant. Sans vouloir attribuer à ce rapprochement une signification que justifieraient peut-être insuffisamment le trop petit nombre de faits sur lesquels il s'appuie, j'ai cru cependant intéressant de le signaler comme pouvant susciter de nouvelles recherches.

L'étude chimique des venins nous a d'ailleurs fourni d'autres données qui sont, croyons-nous, non moins suggestives.

Chose curieuse, si les venins sont très riches en zinc, ils sont aussi *particulièrement riches en soufre*, si bien que ces deux éléments, si on les dose dans une série de venins différents, montrent un parallélisme frappant.

Un premier essai de dosage du soufre, fait dans le venin de cobra, nous avait montré que ce métalloïde existait, dans le venin analysé, en quantité véritablement considérable. Nous y

trouvions, — rapporté à la quantité de matière sèche mise en œuvre — plus de 4 % de soufre. Ce taux, on le voit immédiatement, est celui des matières protéiques animales les plus riches en soufre et il ne se rencontre que dans la kératine des annexes épidermiques, telles que les cheveux, les poils, les cornes, etc. On sait que les matières albuminoïdes proprement dites, même les plus riches en soufre, n'en renferment guère plus de 0,5 à 1,5 %.

Cette observation devait nous conduire à analyser parallèlement le soufre et le zinc dans les venins et à rechercher si, dans la série de ceux dont nous disposions, il était possible de trouver un rapport entre ces deux constituants.

Le dosage du soufre et celui du zinc ont toujours été faits sur trois portions séparées provenant d'un même venin préalablement desséché. L'une de ces portions était utilisée pour le dosage du zinc, les deux autres pour le dosage du soufre. Ce dosage n'était considéré comme valable que si l'on obtenait des chiffres concordants dans les deux analyses.

Pour doser le soufre, la matière organique était détruite par le procédé de Carius (chauffage, en tube scellé, à 180° en présence d'acide nitrique nitreux); le résidu, évaporé à sec, puis traité par l'acide chlorhydrique pour éliminer la silice, était redissous dans l'eau légèrement acidulée par HCl et additionnée d'une solution de chlorure de baryum. Le précipité de sulfate de baryum obtenu était soigneusement lavé, calciné et pesé. Le poids obtenu, multiplié par 0,1375 (coefficient de Denigès), donnait la quantité de soufre contenu dans l'échantillon examiné.

Le tableau suivant indique l'ensemble des résultats fournis par l'analyse de 11 venins différents. En regard des chiffres qui donnent la proportion de soufre p. %, nous avons fait figurer ceux qui indiquent la proportion de zinc trouvée dans des analyses correspondantes ou, pour quelques venins, ceux qui résultent de la moyenne de plusieurs dosages faits sur des échantillons différents.

La seule inspection de ce tableau (T. VI) montre que le soufre, comme le zinc, existe toujours en forte proportion dans les venins. Ceux dans lesquels son taux est le plus élevé peuvent

en contenir près de 5 % alors que les plus pauvres en renferment encore près de 2 %. Mais une autre donnée plus intéressante se dégage de nos analyses : c'est dans le venin des Colubridés que le soufre, comme le zinc, se trouve en quantité particulièrement élevée; on peut dire qu'en moyenne, ces venins renferment deux fois plus de soufre que les venins des Vipéridés. Si, dans chaque catégorie de venins, on n'observe pas un parallélisme absolument rigoureux dans les teneurs respec-

Tableau VI.

VENINS	POIDS du venin sec analysé	SO ⁴ Ba pesé	PROPORTION de S p. 100	PROPORTION de Zn p. 1.000
Colubridés :	gr.	gr.		
<i>Naja tripudians</i>	0,3489	0,1166	4,2	5,2
<i>Id.</i>	0,2034	0,0660	4,46	
<i>Bungarus caeruleus</i>	0,2162	0,0754	4,79	
<i>Naja haje</i>	0,2501	0,0818	4,49	
<i>Sepedon</i>	0,1679	0,0468	3,83	
<i>Hoplocephalus variegatus</i> .	0,3450	0,9230	3,68	3,2
Vipéridés :				
<i>Cerastes cornutus</i>	0,2210	0,0408	2,53	2,2
<i>Id.</i>	0,1808	0,0330	2,55	
<i>Bothrops lanceolatus</i> . . .	0,3785	0,0667	2,47	1,9
<i>Trimeresurus riukianus</i> . .	0,5039	0,0866	2,36	1,7
<i>Vipera libetina</i>	0,1682	0,0236	1,92	1,3
<i>Bitis arietans</i>	0,2317	0,0303	1,80	1,1
<i>Bitis gabonica</i>	0,1811	0,0230	1,69	1,2

tives en soufre et en zinc accusées par chacun d'eux, il n'en est pas moins évident qu'il existe entre les deux éléments dont il s'agit un rapport étroit, qui ne saurait être fortuit.

Le zinc ne serait-il pas engagé, précisément, dans une combinaison ou un complexe protéique particulièrement riche en soufre et n'est-ce pas à ce métalloïde qu'il serait directement lié? Une étude plus approfondie des constituants des venins permettra sans doute de savoir s'il en est réellement ainsi.

Nous avons déjà abordé cette étude délicate, que nous nous proposons de poursuivre avec la collaboration de notre collègue et ami, M. Fourneau.

CHAPITRE VI

DÉDOUBLEMENT DES PHOSPHATIDES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES PAR LES VENINS — RELATIONS AVEC LE ZINC

Quelques mots d'historique. — Le cobra-lécithide de Kyes. — Hypothèse d'une action diastasique des venins sur la lécithine. — Nos recherches personnelles. — Action du venin de cobra sur le sérum. — Les phases de cette action. — Action sur le vitellus d'œuf. — La lysocithine. — Les propriétés hémolytiques de divers venins et leur teneur en zinc. — Dédoublement des acides nucléiques par les venins. — Action sur l'acide nucléique de la levure et sur l'acide thymo-nucléique. — Les propriétés nucléolytiques de divers venins et leur teneur en zinc.

Nous avons montré que le zinc existait, en quantité relativement élevée, dans tous les venins de serpents, et que son abondance y était en rapport, tout à la fois, avec l'intensité et avec la nature des effets produits par ces poisons. Dès lors, tout permet de penser que le zinc conditionne étroitement les processus dont résulte, en dernière analyse, l'action toxique des venins.

Le moment est venu de chercher à quel titre il intervient dans ces processus. Mais ceux-ci, eux-mêmes, en quoi consistent-ils? Quel était, à leur sujet, l'état de nos connaissances avant que l'intervention du zinc ne fût établie? Cette question présente, on le conçoit, un intérêt capital au point de vue qui nous occupe. On ne s'étonnera pas si nous croyons devoir lui consacrer quelques développements : il s'agit là de données relativement neuves, qui nous sont en grande partie personnelles et qui ont précisément servi de point de départ aux recherches qui font l'objet du présent travail.

APERÇU HISTORIQUE.

Jusqu'à ces dernières années, on peut bien dire que le rôle des diastases dans l'action physiologique des venins avait été complètement méconnu; c'est à peine même s'il avait été envisagé.

On savait que les venins, comme les toxines, présentent des caractères qui avaient déjà permis de les rapprocher, à certains égards, des ferments solubles. On leur avait même reconnu quelques propriétés diastasiques, mais celles-ci, du reste assez banales, ne paraissaient jouer aucun rôle dans les effets toxiques (1).

Cette manière de voir semblait si évidente que Noguchi, un des savants qui ont le mieux étudié le venin dans ces dernières années, écrivait : « Le venin des serpents contient un groupe d'agents toxiques entièrement différents des ferments des autres glandes..... Il semble tout à fait certain, ajoute-t-il, que les effets neurotoxiques, hémolytiques, agglutinants des venins ne sont pas dus à l'action de ferments protéolytiques. Les ferments lipolytiques peuvent paraître, à quelques égards, avoir affaire avec les actions hémolytiques et agglutinantes des venins, mais, vu leur faible pouvoir de dédoubler la lécithine ou les graisses neutres, ils ne peuvent pas être les principes auxquels il faut attribuer l'hémolyse considérable que produisent certains venins. »

Pourtant il restait permis de supposer que, dans les venins, à côté des diastases connues, il en existe d'autres auxquelles, de façon plus ou moins directe, les actions toxiques pourraient se rattacher. C'est guidé par cette idée que nous avons, il y a déjà près de dix ans, entrepris une série de recherches sur l'action hémolytique des venins.

Parmi les multiples actions physiologiques des venins, celle-ci était à la fois une des plus simples à analyser et une des plus importantes au point de vue doctrinal, puisque c'est précisément dans l'étude de l'hémolyse par les venins qu'Ehrlich et ses élèves avaient cru trouver un des fondements les plus

(1) FLEXNER et NOGUCHI (*Univ. [of Pennsylv. Med. Bull.*, 1902); LAUNOY (*Acad. Sciences*, 1902) et moi-même (*Acad. Sciences*, 1902) avons montré que la plupart des venins attaquent faiblement la gélatine, la caséine et la fibrine. J'ai indiqué d'autre part (*Lect. Acad. Méd.*, in *Presse Méd.*, 1910) qu'ils peuvent coaguler le lait et kinaser le suc pancréatique inactif (*Acad. Sciences*, 1902); NEUBERG et ROSENBERG (*Berl. klin. Woch.*, 1907) leur ont attribué, en outre, le pouvoir de dédoubler faiblement les graisses.

L'étude de ces diverses actions diastasiques a été reprise récemment par HOUSSAY et NEGRETTE (*Revista del Instituto Bacteriologico de Buenos Aires*, 1918) qui ont fourni à leur sujet de nouveaux et très intéressants documents.

solides de leur conception générale des phénomènes d'immunité.

Pour saisir tout l'intérêt de la question, il faut se rappeler comment elle se présentait au moment où nous l'avons abordée :

On connaissait depuis longtemps l'action hémolysante des venins et l'on avait appris, par les expériences de Flexner et Noguchi (1), que la présence d'une trace de sérum sanguin est indispensable pour que cette action se manifeste; Kyes (2), à son tour (en partie avec Sachs), avait montré que la substance à laquelle le sérum doit son pouvoir complémentaire vis-à-vis du venin — substance thermostable (Calmette) (3) et soluble dans l'éther — était vraisemblablement la lécithine. Il s'assurait, d'ailleurs, qu'on obtient les mêmes résultats en substituant la lécithine au sérum lui-même. Kyes admit, conformément à la doctrine d'Ehrlich, que la lécithine devait former, avec un principe du venin, une véritable combinaison dont dépendait directement l'action hémolysante.

Démontrer que ce corps était bien une entité chimique, avait pour l'école d'Ehrlich une importance considérable : c'était apporter un argument de fait, presque décisif, à la théorie chimique de l'immunité, alors vivement battue en brèche par quelques biologistes et en particulier par Bordet.

Cet argument, Kyes crut l'avoir apporté. En agitant une solution aqueuse de venin avec une solution chloroformique de lécithine, il obtint un corps nouveau, dont les caractères

(1) FLEXNER et NOGUCHI : Snake venom in relation to hemolysis, bacteriolysis and toxicity. *Journ. of Exp. Med.*, t. VI, p. 277, 1902 et *Univ. of Pennsylv. Med. Bull.*, t. XVI, p. 438, 1901-1902.

(2) KYES : Ueber die Wirkungsweise des Cobragiftes. *Berl. klin. Woch.*, t. XXXIX, p. 886 et p. 918, 1902.

KYES et SACHS : Zur Kenntniss der Cobragift activierenden Substanzen. *Berl. klin. Woch.*, t. XL, p. 21 et p. 57, 1903.

KYES : Über die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden. *Berl. klin. Woch.*, t. XL, p. 956 et p. 982, 1903.

KYES : Cobragift und Antitoxin. *Berl. klin. Woch.*, t. XLI, p. 494, 1904.

KYES : Lecithin und Schlangengift. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, t. XLI, p. 273, 1904.

KYES : Bemerkungen über die Lecithinbildung. *Biochem. Zeitsch.*, t. VIII, p. 42, 1908.

KYES : Venom hemolysis. *Journ. of Infect. Diseases*, t. VII, p. 181, 1910.

(3) CALMETTE : Sur l'action hémolytique du venin de Cobra. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXVIII, p. 1079, 1902.

n'étaient ni ceux de la lécithine, ni ceux du venin primitif, et qui possédait des propriétés hémolytiques extrêmement énergiques; à ce corps, il donna le nom de « cobralécithide ».

L'existence du « cobralécithide » ne fut cependant pas admise sans conteste. Lüdeke (1) émit l'opinion qu'il s'agissait, non pas d'une combinaison du venin avec la lécithine, mais d'un dérivé de cette dernière substance, résultant peut-être d'une action diastasique du venin; Dungern et Coca (2), puis Manwaring (3) adoptèrent la même opinion, mais sans l'appuyer d'aucun argument démonstratif. D'autres enfin, comme Arrhénius (4) et Bang (5), refusèrent toute espèce de valeur aux interprétations que nous venons de rappeler, quelles qu'elles fussent. Bang alla même jusqu'à dénier à la lécithine toute participation au processus hémolytique.

Tel était l'état de la question au moment où nous en avons repris l'étude avec notre élève M^{lle} Ledebt, étude que nous avons poursuivie ensuite, pour la partie spécialement chimique avec notre collègue M. Fourneau.

On verra plus loin comment ces recherches devaient nous inviter à étudier l'action des venins sur les acides nucléiques.

Ces travaux se rattachent tous étroitement à notre étude actuelle, car il nous ont amené à mettre en évidence dans les venins des diastases assez spéciales pour que l'on y pût soupçonner la présence d'un métal particulier. De fait, nous y avons trouvé le zinc. Mais malgré la concordance de ce résultat avec l'idée directrice, il n'était pas superflu de rechercher, en outre, des relations quantitatives entre l'activité des diastases considérées et l'abondance relative du zinc dans les venins divers. Comme nous le verrons, ces sortes de relations existent réelle-

(1) LÜDEKE : Zur Kenntniss der Glycerinphosphosäure und des Lecithins. *Inaug. Dissert.*, Munich, 1905.

(2) DUNGERN et COCA : Ueber Hemolyse durch Schlangengift. *Münch. med. Woch.*, t. LIV, p. 2317, 1907.

(3) MANWARING : Ueber die Lecithinase des Cobragiftes. *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, t. VI, p. 513, 1910.

(4) ARRHÉNIUS : Hemolytische Versuche. *Bioch. Zeitsch.*, t. XI, p. 161, 1908.

(5) BANG (J.) : Cobragifte und Hemolyse. *Bioch. Zeitsch.*, t. XI, p. 521, 1908.

BANG (J.) : Zur Frage der Cobralecithid. *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, t. VIII, p. 202, 1910.

ment, témoignant que le zinc est bien un constituant spécifique des ferments dont il est question.

Somme toute, diastases des venins et zinc des venins sont choses indissolublement liées.

Logiquement donc, c'est de façon assez explicite que nous devrions rapporter ici les faits que nous avons observés en mettant en œuvre, dans des conditions expérimentales appropriées, les diastases les plus caractéristiques des venins. Qu'on nous permette, néanmoins, de nous contenter, à leur sujet, d'un rappel assez succinct et de renvoyer, pour plus de détails, à des publications antérieures où nous les avons exposées.

I. — DIASTASES DES VENINS ET HÉMOLYSE. RELATIONS AVEC LE ZINC.

Avec M^{lle} Ledebt (1), nous avons élucidé les rôles respectifs du venin et du sérum dans la destruction des globules rouges, en montrant que le venin contient une diastase, dont l'action sur le sérum aboutit à la formation d'une hémolysine.

Cette démonstration, nous n'avons pu la mener à bien qu'en modifiant la technique suivie jusque-là. Après avoir mélangé du venin de cobra et du sérum de cheval en de certaines proportions, nous abandonnions d'abord les mélanges à eux-mêmes; ensuite, pour suivre, étape par étape, la marche du processus, nous prélevions de temps en temps une fraction du liquide, que nous faisions agir sur les globules rouges, suivant des proportions déterminées.

On ne peut obtenir de résultats exacts et clairs quand, à l'exemple de tous nos prédécesseurs, on ajoute d'emblée les globules rouges au mélange, car ceux-ci entravent rapidement la réaction réciproque du venin et du sérum et les faibles doses de venin, particulièrement intéressantes à étudier, restent

(1) C. DELEZENNE et S. LEDEBT : Action du venin de cobra sur le sérum de cheval. Ses rapports avec l'hémolyse. *C. R. Ac. Sc.*, t. CLII, p. 81, 1911.

C. DELEZENNE et S. LEDEBT : Nouvelle contribution à l'étude des substances hémolytiques dérivées du sérum et du vitellus de l'œuf. *C. R. Ac. Sc.*, t. CLV, p. 4101, 1912.

S. LEDEBT : Contribution à l'étude biologique des venins. *Thèse doct. sciences naturelles*, Paris, 1914.

inefficaces. Évitant cet écueil, nous avons vu les phénomènes se développer avec une régularité qui ne permettait plus aucune hésitation sur leur nature.

Leur évolution se déroule en plusieurs phases :

A. — Dans une première phase, on voit le pouvoir hémolytique du mélange s'accroître jusqu'à un certain maximum. Ce maximum dépend uniquement de la quantité de sérum et non de la quantité de venin, si variable que celle-ci puisse être. Il est atteint d'autant plus rapidement que la quantité de venin est plus forte et la température plus proche d'un optimum. A ces différents traits, on reconnaît déjà le type d'un processus diastasique, dans lequel le rôle de diastase est tenu par le venin.

Nous avons constaté que la substance hémolysante, engendrée par ce processus, dérive des phosphatides du sérum, car ceux-ci disparaissent au cours de la réaction. Cette substance résiste à la température d'ébullition. Elle n'est pas neutralisée par le sérum antivenimeux. Nous avons établi que le venin n'entre certainement pas dans sa constitution, attendu qu'il est possible de l'isoler finalement du mélange et de lui faire opérer, sur une nouvelle quantité de sérum, une réaction identique à la précédente.

B. — Le pouvoir hémolytique du mélange venin-sérum, après avoir passé par un maximum, s'atténue progressivement et finit par disparaître. Cette inactivation résulte aussi d'une action diastasique exercée par le venin. D'une part, en effet, pour l'empêcher de se produire, il faut et il suffit qu'on ajoute au mélange parvenu à l'activité maximale la quantité de sérum antivenimeux dont l'effet neutralisant correspond exactement à la dose de venin primitivement introduite; on observe alors ce fait, en apparence paradoxal : le sérum antivenimeux conservant à un mélange hémolytique venin-sérum ses propriétés toxiques pour les globules.

On peut, à la fin de la seconde phase, comme à la fin de la première, séparer les produits formés et en faire l'étude. Une partie de ces produits, d'ailleurs, se sépare spontanément, au cours du processus, par précipitation spontanée. Ce précipité est constitué presque exclusivement par du savon calcique;

dans le cas du sérum de cheval, nous avons constaté avec E. Fourneau qu'il s'agissait de stéarate de calcium.

Dans cette phase, le venin, qui avait libéré précédemment l'hémolysine, aux dépens des phosphatides du sérum, la dédouble et met en liberté l'acide gras qu'elle renferme, et c'est cet acide gras qui donne des savons calciques avec la chaux du sérum. Ajoutons que l'inactivation ne peut se poursuivre en l'absence de chaux dissoute ; elle s'arrête, en effet, quand, par précipitation ou par dialyse, on soustrait au milieu la chaux qu'il contient, et elle recommence à évoluer quand on la lui restitue.

C. — Les mélanges, une fois devenus totalement inactifs, ont acquis, en outre, un pouvoir empêchant sur divers processus hémolytiques déterminés par les venins.

Dans les mélanges venin-sérum parvenus au terme de leur évolution, le venin n'a pas disparu. En effet, il suffit d'y introduire une nouvelle quantité de sérum pour voir se reproduire la série des transformations que nous avons dites ; l'expérience peut d'ailleurs être répétée un grand nombre de fois par des additions successives de sérum.

Après les recherches qui précèdent, il devenait vraisemblable que le « cobralécithide » de Kyes n'était autre qu'un produit résultant de l'action diastasique du venin sur la lécithine. Tel est en effet le cas ; nous avons pu nous en assurer, avec la collaboration de M^{le} Ledebt (1), en faisant agir le venin sur la lécithine elle-même.

Nous avons d'abord opéré sur la lécithine isolée, mais bientôt nous avons préféré, pour des raisons d'ordre technique, employer une émulsion du vitellus de l'œuf, où la lécithine, finement divisée, se présente dans un état particulièrement favorable à l'attaque des ferments.

D'une façon générale, nous avons suivi, pour étudier les mélanges venin-vitellus, la méthode que nous avons déjà appliquée aux mélanges venin-sérum, et nous avons vu apparaître, puis se développer jusqu'à un certain maximum, un

(1) C. DELEZENNE et S. LEDEBT : Formation de substances hémolytiques et de substances toxiques aux dépens du vitellus de l'œuf soumis à l'action du venin de cobra, t. CLII, p. 81, 1911, et *Thèse* S. Ledebt, Paris, 1914.

pouvoir hémolytique croissant. Contentons-nous de rappeler que le processus manifestait ici encore, et de la façon la plus nette, sa nature diastasique. On pouvait également, une fois la réaction terminée, récupérer le venin (par précipitation par l'alcool absolu) et lui demander, en l'ajoutant à du vitellus, un nouveau cycle d'effets identiques.

Il existe donc dans le venin un ferment qui dédouble la lécithine, et ce dédoublement, nous le verrons plus loin, est d'un type particulier, qu'on n'obtient pas avec d'autres ferments lipolytiques. La lipase pancréatique, notamment, n'engendre pas d'hémolysine aux dépens du vitellus, bien qu'elle en dédouble les graisses. D'autre part, le venin, qui attaque si aisément les phosphatides, est tout à fait inactif vis-à-vis des graisses neutres.

Notons que l'addition préalable de sérum antivenimeux spécifique au mélange vitellus-venin empêche complètement la transformation de la lécithine et le développement des propriétés hémolytiques ; quand celles-ci sont apparues, le sérum antivenimeux approprié se montre au contraire complètement inefficace ; on en doit conclure que ce sérum contient une antidiastase spécifique (antiphosphatidase) à laquelle sont dues les actions dites antihémolytiques des sérums spécifiques (1).

Ajoutons enfin qu'une fois le pouvoir hémolytique développé jusqu'à un certain maximum, le mélange venin-vitellus n'entre pas dans une phase d'inactivation progressive comme le fait le mélange venin-sérum : autrement dit, l'hémolysine, une fois formée, ne subit pas de dédoublement ultérieur sous l'influence du venin ; on peut obtenir toutefois ce dédoublement, mais c'est en faisant agir le venin sur l'hémolysine isolée, puis transportée dans des milieux minéraux déterminés.

Nous avons réussi à isoler la substance hémolytique libérée

(1) Fait intéressant, la diastase lipolytique des venins présente le même degré de résistance à la chaleur que le venin dont elle dérive ; certaines d'entre elles résistent jusqu'aux températures voisines de 100°, et leur résistance est encore accrue dans des conditions de milieu particulières. C'est ainsi que la diastase lipolytique du venin de cobra peut être chauffée à 100° pendant plusieurs heures sans perdre notablement d'activité si elle est dissoute dans une solution d'acide chlorhydrique N/10.

par le venin de cobra aux dépens de la lécithine de l'œuf et nous en avons fait l'étude avec la collaboration de M. Fourné (1).

Cette substance, neutre au tournesol, soluble dans l'eau et dans l'alcool absolu, est complètement insoluble dans l'éther et l'acétone. Nous avons pu l'obtenir cristallisée.

Les analyses ont permis d'établir que cette substance, à laquelle nous avons donné le nom de *lysocithine*, est l'anhydride de l'éther palmitophosphoglycérique de la choline.

L'alcoolyse, faite par la méthode de M. Haller, a montré que l'acide gras contenu dans la lysocithine est bien l'acide palmitique et que les quantités d'acide glycérophosphorique mis en liberté correspondent à la fois aux chiffres de la formule théorique et à ceux qui sont fournis par l'analyse élémentaire.

Sans entrer dans plus de détails sur cette question, nous pouvons conclure que le « cobralecithide », au sens de Kyes, n'existe pas. Le produit séparé par ce savant, et dont la composition pouvait être extrêmement variable suivant les conditions de l'expérience, n'était certainement pas autre chose que la lysocithine, dont on n'avait pas réussi à séparer totalement le venin et qui restait en outre souillée d'une plus ou moins grande quantité de lécithine non transformée.

En solution dans l'eau salée, la lysocithine manifeste des propriétés hémolytiques extrêmement énergiques. A la dose de 0 milligr. 005 à 0 milligr. 01, elle dissout presque instantanément 1 centimètre cube d'émulsion globulaire à 5 %. Elle est capable, d'ailleurs, de détruire *in vitro* nombre d'autres éléments cellulaires : c'est une cytolysine au sens le plus large du mot.

Ajoutons que, pendant le processus qui donne naissance à la lysocithine, on voit se développer, dans les mélanges venin-vitellus, des propriétés toxiques qu'on peut manifester par

(1) C. DELEZENNE et E. FOURNEAU : Etude du lécithide hémolysant, produit par l'action du venin de cobra sur le jaune d'œuf. Communication *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. XV et XVI, p. 354, avril 1914.

C. DELEZENNE et E. FOURNEAU : Constitution du phosphatide hémolysant (lysocithine) provenant de l'action du venin de cobra sur le vitellus de l'œuf de poule. *Mémoire Bull. Soc. Chim.*, t. XV et XVI, p. 421, 1914.

injection intravasculaire (1). Celles-ci ne relèvent pas de la lysocithine seule, bien que ce corps ne manque pas de nocivité. Elles ne résultent pas davantage de la quantité de venin faisant partie du mélange, cette quantité pouvant être jusqu'à 10.000 fois inférieure à la dose mortelle. Tout permet de croire qu'il s'agit d'une substance néoformée, dont nous ignorons, il est vrai, la nature. En tout cas, l'évolution progressive de la toxicité dans les mélanges atteste l'intervention, une fois de plus, d'un processus catalytique.

La plupart des expériences que nous venons de rappeler avaient porté sur le venin de cobra. Nous avons observé, chemin faisant, que d'autres venins de serpents, dont on connaissait déjà les propriétés hémolytiques, peuvent, eux aussi doubler la lécithine, mais nous n'avions fait aucune recherche systématique sur l'ordre dans lequel se seraient leurs activités respectives. Les données nouvelles, concernant leur richesse relative en zinc, nous invitaient à entreprendre cette étude.

Faisant agir, sur le vitellus de l'œuf et sur le sérum de cheval, 6 venins d'espèces différentes dont la teneur en zinc oscillait entre 5,6 ‰, et 1,1 ‰, nous avons constaté que l'intensité de l'action catalytique sur la lécithine, mesurée par l'hémolyse, était bien en corrélation avec les proportions de zinc que nous avons notées.

Pour donner à l'expérience toute sa valeur démonstrative, il fallait opérer avec des venins recueillis tous dans les mêmes conditions; il fallait surtout être assuré qu'aucun d'eux n'avait subi d'atténuation appréciable de ses propriétés primitives. Or il arrive souvent qu'au cours d'une dessiccation trop lentement conduite, les venins surtout s'ils n'ont pas été recueillis très proprement, se contaminent et perdent partiellement ou totalement leur activité. D'autre part les venins, même desséchés, risquent encore de s'altérer, s'ils ne sont pas préservés contre toute trace d'humidité et gardés à l'abri de la

(1) C. DELEZENNE et S. LEDEBT : Formation de substances hémolytiques et de substances toxiques aux dépens du vitellus de l'œuf soumis à l'action du venin de cobra. *C. R. Acad. Sciences*, t. CLII, p. 81, 1911. — Les poisons libérés par les venins aux dépens du vitellus de l'œuf. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXI, p. 121, 1911.

lumière. Nous avons mis d'autant plus de soin à remplir ces desiderata qu'il s'agissait ici de recherches comparatives, relativement délicates.

D'ailleurs, pour vérifier que les venins utilisés répondaient à toutes les exigences, on s'assurait, par une série de contrôles, que plusieurs échantillons, recueillis séparément sur des animaux de même espèce, ne présentaient pas de différences d'activité très appréciables.

Pour comparer les divers venins au point de vue de leurs effets catalytiques, on ne disposait que de deux méthodes expérimentales : celles qui sont employées habituellement dans l'étude des diastases :

1° Evaluer les transformations produites par les divers venins en fonction du temps ;

2° Déterminer pour chacun le seuil de l'action, c'est-à-dire fixer la plus petite dose encore capable d'attaquer très nettement le sérum ou le vitellus de l'œuf.

Les venins employés ont été ceux de cobra indien (*Naja tripidians*), de *Naja haje* (cobra égyptien), de *Sepedon* (serpent cracheur) pour les Colubridés, ceux de *Cerastes cornutus* (vipère à cornes), *Vipera aspis* et *Bitis arietans* (vipère heurtante) pour les Vipéridés. Au point de vue de leur teneur en zinc, ils se classaient, comme le rappelle le tableau VI, suivant l'ordre dans lequel nous venons de les énumérer.

Or ces mêmes venins se sont classés exactement dans le même ordre, au point de vue de leur action diastasique, dans toute une série d'expériences dont voici un type :

Expérience. — Dans une série de tubes à essai renfermant chacun 10 centimètres cubes d'émulsion de vitellus d'œuf dans l'eau salée (1 vitellus pour 100 centimètres cubes d'eau salée), on ajoute la même dose des différents venins à éprouver, soit 0 milligr. 002, et on porte les mélanges à l'étuve à 50°. D'heure en heure on fait des prises de 0 cent. cube 2, on les dilue au 1/100, et l'on porte 0 cent. cube 2 de la dilution sur 1 centimètre cube d'émulsion globulaire à 5 %, en notant l'heure à partir de laquelle les prises déterminent l'hémolyse immédiate des globules (1). Des essais préalables avaient montré en effet que 0 cent. cube 002 des mélanges venin-

(1) Une série d'essais nous ont montré que l'on peut extraire facilement la ysoctithine du vitellus d'œuf, traité par d'autres venins que le venin de cobra. Le corps séparé présente dans tous les cas les mêmes caractères et les mêmes propriétés.

vitellus représentent sensiblement la quantité limite qui suffit à provoquer l'hémolyse instantanée, quand cette quantité est prélevée au moment où les mélanges sont arrivés au terme de leur évolution, c'est-à-dire quand toute la lécithine a été transformée.

Tableau VII.

VENINS	DURÉE DE SÉJOUR DES MÉLANGES A L'ÉTUVE A 50°									PROPORTION
	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	12 h.	16 h.	24 h.	36 h.	48 h.	de Zn p. 1.000
<i>Naja trip.</i> (Cobra).	+									5,2
<i>Naja haje</i>	0	0	+							4,2
<i>Sepedon</i>	0	0	+							3,3
<i>Cerastes cornutus</i> . .	0	0	0	0	+					2,2
<i>Vipera aspis</i>	0	0	0	0	0	0	+			1,3
<i>Bitis arietans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	+	1,1
									faible	

Notons que pour obtenir, avec le venin de *Bitis* — le moins actif de tous et le moins riche en zinc —, l'hémolyse après une heure de séjour des mélanges à l'étuve, il faut employer une dose de venin 500 fois supérieure à celle qui a été utilisée dans l'expérience ci-dessus. D'autre part, en déterminant le seuil d'action de ce même venin, on constate que (pour la quantité de vitellus employé) il correspond à 0 milligr. 001 (1), alors qu'avec le venin de cobra, cinq à six fois plus riche en zinc, il peut descendre au-dessous de 0 milligr. 00001 environ. Ajoutons que pour le venin de ceraste, qui occupe une place intermédiaire, le seuil est environ à 0 milligr. 0003.

L'expérience, répétée en utilisant le sérum de cheval, nous a donné des résultats échelonnés pour les divers venins, dans le même ordre que les précédents; la seule différence est que le seuil est ici sensiblement plus élevé, l'attaque des phosphatides des sérums étant moins facile que celle de l'ovolécithine.

(1) Dans une note publiée il y a quelques années dans le *Bulletin de la Société de Pathologie exotique* (t. VI, p. 50, 1913) R. Beaujean a affirmé que le venin de *Bitis arietans* est dépourvu de tout pouvoir hémolytique. Une série de venins de *Bitis* recueillis par nous-même, sur des reptiles qui nous avaient été envoyés de l'Afrique occidentale française, se sont toujours montrés très nettement hémolytiques bien que leur activité fût, en effet, une des plus faibles que nous ayons observée.

Mais le sérum permet, mieux encore que le vitellus de l'œuf, d'apprécier les différences d'activité, puisque les phénomènes se décomposent ici en deux phases qui se traduisent dans leur ensemble par une courbe successivement ascendante et descendante dont le sommet offre un utile point de repère et dont la partie descendante se prête d'autant mieux à des déterminations chronométriques qu'elle est plus prolongée.

Or les venins de faible activité, à moins d'être utilisés à dose très considérable, n'arrivent pour ainsi dire jamais, quelle que soit la durée de l'expérience, à dédoubler complètement la lysocithine formée au cours de la première phase et à donner finalement des mélanges inactifs. Tel est précisément le cas du venin de vipère et du venin de bitis, pour ne citer que ces deux derniers.

En comparant dans une même expérience ces venins au venin de cobra, on constate que les mélanges cobra-sérum ne déterminent plus, depuis un grand nombre d'heures déjà, la moindre hémolyse, alors que les mélanges vipère-sérum ou bitis-sérum sont à peine à leur maximum.

Il faut souvent attendre plusieurs jours pour voir se manifester, dans ces mélanges, la phase d'activité décroissante, qui traîne péniblement sans aboutir presque jamais à l'inactivité complète.

Expérience. — Ces faits apparaissent d'une façon évidente dans le tableau ci-contre (T. VIII). La dose de venin utilisée a été de 0 milligr. 1 pour 5 centimètres cube de sérum de cheval préalablement chauffé à 56°. Les mélanges ont été maintenus à 50° et l'on a fait des prises successives de 0 cent. cube 2 que l'on a portées directement sur 1 centimètre cube d'émulsion globulaire à 5 %.

Aux procédés d'appréciation que nous venons d'indiquer, on peut, à des périodes déterminées, substituer le dosage de la lécithine ou des phosphatides non transformés. Les renseignements fournis par cette méthode sont en tout superposables aux précédents et confirment, pour les venins étudiés, le classement que nous en avons établi.

En somme, nous constatons une relation des plus évidentes entre l'intensité des actions diastatiques qui donnent naissance à la substance hémolysante, et l'abondance relative du zinc. Il

serait en vérité surprenant que, sur la série de cas différents que nous avons étudiés, une telle concordance fût purement fortuite.

Tableau VIII.

VENINS	DURÉE DE SÉJOUR DES MÉLANGES A L'ÉTUVE A 50°											
	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	16 h.	24 h.	36 h.	48 h.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.
<i>Naja trip.</i> (Cobra).	+	+	+	+	0	0						
<i>Naja haje</i>	0	+	+	+	+	+	0	0				
<i>Sepedon</i>	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0		
<i>Cerastes cornutus</i> .	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
<i>Vipera aspis</i> . . .	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bitis arietans</i> . . .	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+

D'ailleurs, nous allons retrouver cette même relation avec une diastase d'espèce tout autre et il deviendra dès lors manifeste que le simple hasard ne saurait être en cause.

II. — CATALYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES PAR LES VENINS. — RELATIONS AVEC LE ZINC.

Les données fournies par l'étude de l'action des venins sur la lécithine nous ont conduit à nous demander si ces poisons, qui catalysent si aisément les graisses phosphorées, n'auraient pas la propriété de dédoubler également d'autres éthers phosphoriques complexes : les acides nucléiques.

La question présentait un double intérêt. Il s'agissait avant tout de savoir si une part de la toxicité des venins ne doit pas être attribuée à leur action sur ces substances, qui sont des constituants fondamentaux du noyau cellulaire. D'un autre côté il était permis d'espérer que les résultats de l'hydrolyse des acides nucléiques par les venins, si nous arrivions à la produire, pourraient fournir d'utiles documents sur la constitution de ces corps, qui est encore imparfaitement élucidée.

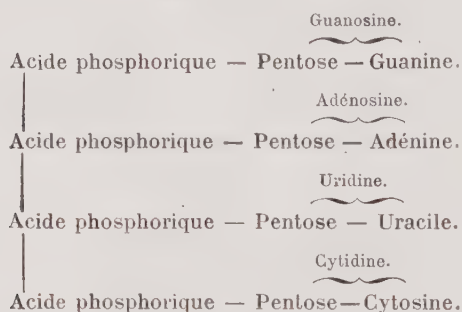
Pour faciliter l'exposé des faits que nous avons observés, rap-

pelons en quelques mots les données essentielles relatives à la constitution et à la structure des acides nucléiques.

Le plus simple d'entre eux et le mieux connu est l'acide nucléique de la levure de bière. C'est le type des acides nucléiques végétaux.

Les travaux très remarquables de Levene (1) et de ses collaborateurs ont établi que ce corps est formé de 4 nucléotides unis entre eux par leur chaînon phosphorique, chaque nucléotide étant lui-même constitué par une molécule d'acide phosphorique unie à une base par l'intermédiaire d'un pentose : le *d*-ribose. On sait, d'autre part, que, sur les 4 bases, deux, la guanine et l'adénine, sont des bases puriques alors que les deux autres, l'uracile et la cytosine, sont des bases pyrimidiques.

Schéma de l'acide nucléique de la levure :



Par des hydrolyses ménagées dont plusieurs sont d'une technique particulièrement délicate, on a pu décomposer l'acide nucléique en ses 4 nucléotides, et chacun de ceux-ci en ses 3 constituants : on a pu également obtenir les groupements sucre-base, que Levene a appelés les nucléosides et dont le type est la guanosine (pentose-guanine).

Les acides nucléiques animaux, dont le type est l'acide thymo-nucléique, sont moins bien définis ; on ignore, en particulier, la nature de l'hydrate de carbone qui entre dans leur constitution. On sait toutefois que ce sont aussi des tétranucléo-

(1) Pour la bibliographie de la question consulter : W. JONES, *Nucleic Acids, their chemical properties and physiological conduct*, Monographs of Biochemistry, Londres, 1914.

tides, analogues aux acides nucléiques végétaux, mais dans lesquels l'uracile est remplacé par une base pyrimidique depuis longtemps connue, la thymine.

Nous avons étudié, avec notre élève H. Morel, l'action des venins sur l'un et l'autre type : acide nucléique de la levure et acide thymo-nucléique (1).

Une première série d'expériences, faites avec le venin de cobra, nous a montré que celui-ci, conformément à notre hypothèse, dédoublait les acides nucléiques.

Nous opérons sur des nucléates de soude rigoureusement neutres à la phtaléine, en solution à 1 ou 2 % dans l'eau physiologique. Le venin y était ajouté en proportions variables et nous laissons la réaction se poursuivre dans l'étuve à 50°.

Après des temps variant entre quelques heures et plusieurs jours, on soumettait les mélanges aux différentes épreuves qui permettaient d'observer les transformations produites et d'en faire la mesure.

Le premier fait que l'on observe, c'est que les acides nucléiques, soumis à l'action du venin de cobra, perdent progressivement leur propriété d'être précipités par l'acide chlorhydrique. S'il s'agit de l'acide thymo-nucléique, dont les solutions sont très gélifiables et se prennent en masse à froid, on constate en outre — et c'est ici le premier phénomène facilement observable — que le temps nécessaire à la gélification s'allonge au fur et à mesure que l'action du venin se poursuit. Après quelques heures d'action, les solutions restent tout à fait liquides, même si elles sont portées dans la glacé.

D'autre part, on observe que les mélanges, primitivement neutres à la phtaléine et au tournesol, deviennent acides vis-à-vis de ces indicateurs. Cette acidité, dont le développement progressif, mesuré par titration à la soude, permet de suivre la marche de l'action diastasique, est due à la libération de l'acide phosphorique et à la formation de phosphate mono-

(1) C. DELEZENNE et H. MOREL. — Catalyse des acides nucléiques par les venins de serpents. *C. R. Acad. des Sciences*, t. CLXVIII, janvier 1919.

sodique. En effet, d'une part, le milieu reste toujours alcalin à l'hélianthine et, d'autre part, la titration au sucrate de chaux donne un chiffre qui correspond sensiblement aux $3/2$ du chiffre obtenu en utilisant pour le tirage une solution équimoléculaire de soude. La quantité d'acide phosphorique libérée peut d'ailleurs être dosée exactement en l'évaluant sous la forme de phosphate ammoniaco-magnésien.

Quelle est la nature exacte des transformations que fait subir le venin aux acides nucléiques? A ce sujet, nous n'avons encore fait de recherches approfondies qu'en ce qui concerne l'acide nucléique de la levure.

Nous avons constaté que l'acide phosphorique de cet acide nucléique est facilement libéré, alors que — et contrairement à ce qui se passe avec les nucléases des tissus, par exemple — les nucléosides ne sont pas dédoublés (1). En effet on ne peut, à aucun moment, révéler dans le milieu la présence de bases puriques ou de bases pyrimidiques libres, et l'on ne peut davantage en isoler le pentose, qui forme avec ces bases les composés glucosiques que Levene a réussi à séparer par l'hydrolyse neutre. Du reste, il est facile de mettre en évidence, dans le milieu, ces glucosides eux-mêmes, que le venin n'a pas modifiés. C'est le cas, tout au moins, pour les nucléosides puriques : nous avons pu aisément, en suivant les méthodes de séparation déjà indiquées par Levene, obtenir la guanosine et l'adénosine parfaitement cristallisées. Nous les avons identifiées par diverses méthodes, dont la plus simple consiste à les dédoubler, par ébullition avec un acide minéral, l'une en guanine et pentose, l'autre en adénine et pentose.

Je n'ai pu m'étendre davantage ici sur tous ces faits, que nous développerons, M. H. Morel et moi, dans des mémoires spéciaux.

(1) On sait depuis longtemps que les nucléases des tissus libèrent à la fois l'acide phosphorique et les bases puriques ou pyrimidiques des acides nucléiques. Ce sont les bases puriques qui, transformées à leur tour par d'autres ferments (désamidases et oxydases), donnent finalement l'acide urique, produit ultime du métabolisme des acides nucléiques dans l'organisme animal.

Consulter : W. JONES, *loc. cit.*

Qu'il me suffise d'ajouter que cette action du venin de cobra sur les acides nucléiques est bien de nature diastasique. Outre qu'elle obéit aux lois générales des actions catalytiques (efficacité des petites doses avec le temps, vitesse de réaction très forte au début, non-participation du catalyseur à la constitution des produits formés, etc.), elle ne se manifeste plus quand on opère avec du venin porté pendant quelques minutes à 100° et se trouve empêchée par l'addition de sérum antivenimeux spécifique.

Pour la clarté de l'exposé, nous nous sommes borné jusqu'ici à résumer nos expériences sur le venin de cobra; mais les propriétés que nous avons reconnues à ce dernier sont loin de lui être spéciales; nous les avons retrouvées dans tous les venins que nous avons étudiés.

Nous les avons, disons-nous, retrouvées dans tous, mais non pas à un égal degré, tant s'en faut. De nouveau, nous voyons ici les Colubridés se distinguer franchement des Vipéridés; l'activité du venin, vis-à-vis des deux acides nucléiques, est bien plus intense chez les premiers que chez les seconds. On s'en rend compte par l'abondance relative des produits de dédoublement, et surtout on mesure très bien les différences par le degré d'acidité qu'on obtient dans un temps donné. L'écart entre Colubridés et Vipéridés est, à ce point de vue, très considérable; il se dénonce plus nettement encore que dans les expériences sur l'hydrolyse de la lécithine; cela peut tenir, du reste, à la facilité avec laquelle la lécithine se laisse dédoubler.

Or, nous le savons déjà, les Colubridés et les Vipéridés se différencient tout aussi franchement par l'abondance relative du zinc dans leurs venins. Du reste, d'une façon générale, même d'une espèce à l'autre, dans chaque groupe, l'activité diastasique se dégrade à peu près parallèlement à la teneur en zinc.

Les faits expérimentaux que nous allons rapporter à titre d'exemples sont d'une interprétation assez claire pour nous dispenser de plus larges développements.

Expérience. — Une solution de nucléate de soude (de la levure) à 2 % dans l'eau salée physiologique est distribuée par fractions de 15 cm³ dans des

tubes à essai. A chacun d'eux, on ajoute respectivement 5 milligrammes de venin dissous dans 2 cent. cubes d'eau salée physiologique. L'essai porte sur 8 venins différents.

Une autre série, en tout comparable à la première, est faite en substituant au nucléate de soude du thymo-nucléate de soude.

Les deux séries, faites aussi aseptiquement que possible, sont portées à l'étuve à 50°. L'acidité développée est titrée après seize heures avec de la soude N/40. Les chiffres du tableau IX indiquent le nombre de centimètres cubes qu'il a fallu employer.

Tableau IX.

VENINS	QUANTITÉ DE SOUDE N/40 utilisée		PROPORTION de Zn p. 1.000
	acide nucléique	acide thymo- nucléique	
Colubridés :			
<i>Naja trip.</i> (Cobra).	7,8	5,3	5,4
<i>Bungarus cæruleus</i>	5,5	5,7	4,3
<i>Sepedon</i>	3,9	3,6	3,3
<i>Hoplocephalus variegatus</i>	3,7	3,1	3,2
Vipéridés :			
<i>Cerastes cornutus</i>	1,2	1,5	2,1
<i>Bothrops lanceolatus</i>	1,1	1,7	1,9
<i>Vipera aspis</i>	0,9	1,1	1,3
<i>Bitis arietans</i>	0,7	0,9	1,1

Nous nous sommes demandé si la corrélation entre la proportion du zinc et l'activité diastasique ne se manifesterait pas aussi par l'examen de plusieurs échantillons de venins provenant d'une seule et même espèce. Une telle contre-épreuve offrait un intérêt facile à concevoir. Quand nous passons d'une espèce à l'autre, ce n'est pas seulement la teneur en zinc qui peut, par ses variations, intervenir dans les résultats, mais aussi d'autres facteurs contingents, capables d'agir sur l'activité diastasique dans une certaine mesure. Par contre, des échantillons de la même espèce, grâce à la similitude de leur composition générale, doivent présenter entre eux, au point de vue de ces influences parasites, beaucoup plus d'uniformité, et, parlant, permettre à l'influence propre du zinc de se manifester plus purement. A la vérité, les inégalités de teneur en zinc, entre de tels échantillons, ne sont jamais très marquées, mais nous possédons, dans les déterminations d'acidité, une méthode

suffisamment précise pour faire apparaître des écarts, même très faibles, dans l'activité catalytique. Nous nous trouvons avoir à notre disposition quatre spécimens de venin de cobra répondant aux conditions désirées. L'expérience a été démonstrative.

Expérience. — Deux spécimens différents de venin de cobra, contenant respectivement 5,6 ‰ et 4,9 ‰ de zinc, sont ajoutés, à la dose de 5 milligr., à 20 centimètres cubes d'une solution de nucléate de soude à 2 ‰ dans l'eau salée physiologique. Les tubes sont portés à l'étuve à 50° pendant douze heures. On titre l'acidité développée à la soude N/40. On obtient les chiffres suivants : 6 cc. 8 pour le premier tube, 6 cc. 2 pour le second.

L'expérience est répétée dans les mêmes conditions, sauf que le temps d'étuve est de seize heures, avec deux autres échantillons de venin de cobra, renfermant 5,2 ‰ et 4,5 ‰ de zinc. Les chiffres de soude N/40 nécessaire pour neutraliser l'acidité développée ont été respectivement 6 cc. 5 et 6 cc. 1.

Nous pouvons, ce nous semble, sans autres commentaires, tenir pour établie, entre l'*activité nucléolytique des venins* et la *teneur en zinc*, une *corrélation étroite*, dont les diastases préparatrices de l'hémolyse nous avaient déjà fourni un exemple.

Ces faits nous amènent à envisager incidemment la part que peut prendre le zinc, par le fait même de son action sur les acides nucléiques, aux phénomènes toxiques que déterminent les venins, spécialement ceux des Colubridés qui sont à la fois les plus riches en zinc et les plus violents. Plus encore que le ferment qui décompose les phosphatides, abondant lui aussi dans ces venins, celui qui s'attaque aux acides nucléiques, constituants essentiels du noyau cellulaire, doit être capable de produire, par injection à l'animal, des troubles considérables et d'une grande diffusion. On a d'ailleurs relevé depuis longtemps, parmi les effets que provoquent les venins, des lésions nucléaires particulièrement marquées. Si l'on objecte que de semblables altérations sont assez communes dans des intoxications variées, nous pouvons apporter, comme preuve de l'action vraiment élective de certains venins sur les noyaux, un fait singulièrement significatif par son caractère tout à fait exceptionnel : chez un animal (grenouille) ayant succombé tardivement à l'injection d'une faible dose de venin de cobra,

nous avons, avec M. A. Pettit, constaté des karyokinèses dans les cellules nerveuses de la moelle.

Des observations que nous avons rapportées dans ce chapitre, une donnée générale se dégage nettement : certaines propriétés des venins, qui sont des plus importantes, dérivent de l'activité de diastases spéciales, et cette activité est elle-même en *relation quantitative avec l'abondance du zinc*. Il nous paraît légitime d'en inférer que, suivant toute vraisemblance, le zinc constitue un élément spécifique des diastases les plus caractéristiques des venins de serpents.

Nous nous sommes borné, jusqu'à présent, à constater des faits. Ils nous semblent assez suggestifs pour nous autoriser maintenant à une tentative d'interprétation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

ET

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Du point où nous sommes parvenus dans notre étude, nous pouvons, ce nous semble, chercher à nous représenter quelle est la signification physiologique du zinc, d'abord dans les venins et ensuite, par analogie, dans la cellule vivante dont les processus intimes échappent aux prises directes de l'observation.

Notre étude sur les venins démontre un fait essentiel : le zinc affecte un rapport quantitatif incontestable avec l'activité de deux processus diastasiques bien définis.

Ajoutons immédiatement que ce n'est pas là une condition commune à toutes les réactions diastasiques des venins. La même relation, en effet, ne se retrouve à aucun degré pour d'autres ferments depuis longtemps connus : nous voulons parler notamment des ferments protéolytiques et des ferments coagulants. On n'en saurait aucunement douter. Il suffit de rappeler que les ferments auxquels nous faisons allusion sont incomparablement plus actifs chez les Vipéridés que chez les Colubridés; or la teneur en zinc obéit, nous le savons, à une règle précisément inverse. L'exemple du venin de cobra est à lui seul, pleinement significatif : maximum de zinc, coïncidant avec des propriétés protéolytiques ou coagulantes nulles ou presque nulles.

La conclusion s'impose et elle est à retenir : c'est à des ferments bien déterminés, bien spécifiés que le zinc est exclusivement associé.

Il devient difficile, dès lors, de ne pas attribuer à ce métal une part importante, essentielle même, dans la constitution de ces ferments.

D'ailleurs, cette manière de voir s'accorde avec l'idée qu'on se fait aujourd'hui de la participation de certains éléments minéraux aux actions diastasiques. Dans les diastases considérées, le zinc occuperait, à côté d'un constituant organique, la même place et le même rang que le manganèse, par exemple, dans les oxydases telles que les a définies Gabriel Bertrand.

Au surplus, on ne saurait guère songer à rapporter au zinc seul les effets catalytiques observés. Nous n'avons obtenu aucun résultat ni sur la lécithine, ni sur les acides nucléiques, en utilisant les sels de zinc, même les plus dissociables. Nous n'avons pas réussi davantage en employant du zinc colloïdal, que M. Girard avait bien voulu préparer sur notre demande, dans le laboratoire de M. Perrin. Il se peut que de nouveaux essais qui sont en cours, notamment avec le sulfure de zinc colloïdal, nous donnent des résultats positifs. De tels résultats auraient un grand intérêt, en ce qu'ils complèteraient utilement notre démonstration ; mais encore faudrait-il qu'ils fussent d'un ordre de grandeur considérable, pour nous autoriser à regarder comme relativement négligeable, dans la diastase, le rôle de la matière organique.

Que le zinc soit fortement lié dans les venins, à la matière organique, on n'en saurait douter, puisqu'on ne peut le séparer, nous l'avons dit, ni par précipitation, ni par dialyse, même en présence d'HCl.

Cette partie organique, à laquelle est lié le zinc, nous en ignorons la constitution. Nous pouvons néanmoins, d'après certaines données que nous avons exposées, considérer comme vraisemblable qu'il s'agit d'une protéose, et d'une protéose particulièrement riche en soufre.

Quoi qu'il en soit, c'est bien le zinc qui doit, dans la catalyse, jouer le rôle chimiquement actif. Ce n'est pas à dire, loin de là, qu'à d'autres égards, la partie organique de la diastase n'ait pas tout autant d'importance : d'une part, elle forme le support indispensable à la manifestation intégrale de l'activité chimique caractéristique ; d'autre part, c'est elle qui confère au

ferment la spécificité biologique, qu'atteste son aptitude à engendrer un antiferment lui-même spécifique.

En somme, la conception actuellement admise sur la constitution des diastases s'adapte de façon très satisfaisante aux faits particuliers que nous avons observés. Si cette conception est appelée à se modifier dans l'avenir, toujours est-il qu'on devra lui demander d'expliquer ce fait essentiel qui se dégage de nos recherches : le *rapport de subordination entre certaines activités catalytiques des venins et la présence du zinc*.

Ainsi l'étude du zinc dans les venins nous conduit, en définitive, à considérer ce métal comme l'agent essentiel de certaines catalyses. Dans la *cellule animale*, où nous avons établi que sa *présence est constante*, il remplit sans doute une fonction du même ordre, c'est-à-dire qu'il intervient dans les processus catalytiques que le métabolisme intracellulaire utilise et parmi ces processus, figurent probablement, *entre autres*, ceux-là mêmes que nos recherches ont mis en évidence.

A l'appui de cette supposition, rappelons ce fait, déjà souligné, que, chez les mammifères, les organes les plus riches en phosphatides et en acides nucléiques — composés phosphorés hydrolysables par les venins — sont également ceux où l'analyse nous a révélé les quantités de zinc les plus élevées ; ces substances, *in vivo*, comme *in vitro*, seraient au nombre des constituants cellulaires dont les transformations sont subordonnées à l'intervention du zinc.

S'il est permis d'imaginer dans l'intimité des tissus des processus analogues à ceux que nous pouvons observer en dehors de l'organisme, surtout avec les ferments, l'hypothèse que nous indiquons paraît, en somme, assez satisfaisante pour l'esprit, mais c'est en inspirant des recherches ultérieures qu'elle pourra montrer quelque utilité et c'est par confrontation avec de nouveaux faits qu'elle laissera éprouver sa justesse.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Botanique. — Le Zinc chez les Végétaux.

Géologie. — Les origines de la vie à la surface du globe, d'après les documents paléontologiques.

Vu et approuvé :

Paris, le 23 décembre 1918.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,
PAUL APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 23 décembre 1918.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
L. POINCARÉ.
